ZUR BEDEUTUNG VON THIOLEN FÜR DIE KALIUMPERMEABILITÄT LANGERHANSSCHER INSELN DER RATTE

Untersuchungen mit Streptozocin und exogenem Insulin

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Michael Mark
aus Horb a. N.

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

ZUR BEDEUTUNG VON THIOLEN FÜR DIE KALIUMPERMEABILITÄT LANGERHANSSCHER INSELN DER RATTE

Untersuchungen mit Streptozocin und exogenem Insulin

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Michael Mark
aus Horb a. N.

1983

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 1983

Dekan: Prof. Dr. J. Strähle

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.P.T. Ammon

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Reinhard

Sabina
und
meinen Eltern
gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde im Mai 1981 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im Mai 1983 abgeschlossen.

Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon
danke ich für die Überlassung des Themas, seine freundliche Unterstützung und stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn M. Wahl danke ich für die gute Zusammenarbeit während der Versuche zur Methodik.

Weiter möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Ammon für die ständige Diskussionsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit bedanken.

ABKÜRZUNGEN

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cpm	counts per minute
DIP	Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazid)
dpm	disintegrations per minute
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
HEPES	N-2-Hyroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
IRI	Immunreaktives Insulin
KRB	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung
MNU	Methylnitrosoharnstoff
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert
p-CMB	para-Chlormercuribenzoat
PPS	Pentosephosphatshunt
RIA	Radioimmunoassay
RSA	Rinderserumalbumin
SEM	Standard error of the mean
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Stand der Forschung	1
1.1.1	Glucoseinduzierte Insulinsekretion	1
1.1.2	Kaliumpermeabilität und Insulinsekretion	5
1.1.3	Streptozocin und Insulinsekretion	23
1.1.4	Exogenes Insulin und Insulinsekretion	29
1.2	Fragestellung	32
2.	MATERIAL	35
2.1	Versuchstiere	35
2.2	Geräte	35
2.3	Chemikalien	37
2.3.1	Bezogene Chemikalien und Enzyme	37
2.3.2	Dialyse von Rinderserumalbumin	38
2.4	Elektrolytlösungen	39
2.4.1	Hanks Lösung	39
2.4.2	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung	39
2.5	Inkubationsmedien	41
2.5.1	Vorinkubationsmedium	41
2.5.2	Inkubationsmedium zur Rubidiumaufnahme	41
2.5.3	Waschmedium	42
2.5.4	Effluxmedium	42
2.5.5	Medium für die Perifusionsversuche	43
2.5.6	Herstellung der Medien mit Streptozocin	44
2.5.7	Herstellung und Überprüfung der Medien mit exogenem Insulin	45
2.6	Gefäße	46
2.7	Perifusionsapparatur	48
2.7.1	Aufbau	48
2.7.2	Vorbereitung der Perifusionsapparatur für die Versuche	54
2.7.3	Reinigung der Perifusionsapparatur	54

3.	EXPERIMENTELLER TEIL	55
3.1	Methodenwahl	55
3.2	Versuchsablauf	58
3.2.1	Isolierung Langerhansscher Inseln nach Lacy und Kostianovsky	58
3.2.1.1	Präparation des Pankreas	58
3.2.1.2	Isolierung der Langerhansschen Inseln	59
3.2.2	Vorinkubation	60
3.2.3	Beladung der Inseln mit Rubidium	60
3.2.4	Waschvorgang	61
3.2.5	Effluxmessung	61
3.2.6	Bestimmung des 86-Rubidiumgehaltes in den Inseln	62
3.2.7	Messung und Berechnung der 86-Rubidiumkonzentration in der Insel	62
3.2.8	Versuche zur Insulinsekretion	65
3.2.8.1	Versuchsablauf	65
3.2.8.2	Radioimmunologische Bestimmung von Insulin	66
3.2.8.3	Berechnung des sezernierten Insulins	67
3.2.9	Veränderungen der Methodik und Einführung einer Perifusionsmethode	68
3.2.9.1	Präparation des Pankreas	68
3.2.9.2	Isolierung der Langerhansschen Inseln	68
3.2.9.3	Vorinkubation	70
3.2.9.4	Inkubation zur Rubidiumaufnahme	70
3.2.9.5	Waschvorgang	70
3.2.9.6	Perifusion	71
3.2.9.7	Berechnung der Effluxrate	73
3.2.9.8	Statistische Auswertung	74
3.3	Versuche zur Aufnahme von 86-Rb in Langerhanssche Inseln	76
3.3.1	Ausgangsbedingungen	76
3.3.2	Variation des Waschvorganges bei Leernetzen	78
3.3.3	Übertragung der Ergebnisse aus den Leerversuchen auf Versuche mit Inselmaterial	80

3.3.4	Waschmedium mit Glucose 16,7 mM	81
3.3.5	Versuch mit D-6-14C-Glucose	82
3.3.6	Erstellen einer Aufnahmekurve für 86-Rb in Langerhanssche Inseln	84
3.3.7	Versuche zur Insulinsekretion	87
3.3.8	Erstellen einer Aufnahmekurve für 86-Rb in isolierte Langerhanssche Inseln. Zusatz von Dextran 6 % zum Inkubationsmedium	96
3.3.8.1	Netzleerversuch mit Dextranzusatz 6 % im Hauptinkubationsmedium	97
3.3.8.2	Inkubation von Langerhansschen Inseln	98
3.3.9	Ersatz des Kalium in der KRB-Lösung durch äquimolare Mengen an Rubidium	100
3.3.10	Inkubation mit KRB, Dextran 6 % und Glucose 16,7 mM	101
3.3.11	Versuche zur Insulinsekretion	103
3.3.12	Zur Rolle von Rinderserumalbumin bei der Rubidiumaufnahme in isolierte Langerhanssche Inseln	106
3.3.12.1	Einfluß der Vorbehandlung der Inseln auf die Rubidiumaufnahme während einer 30-minütigen Hauptinkubation	106
3.3.12.2	Einfluß des pH-Wertes der Medien auf die Rubidiumaufnahme in Langerhanssche Inseln während 30-minütiger Hauptinkubation	108
3.3.12.3	Versuche mit RSA 5 %. im Medium	111
3.3.13	Erstellen einer Aufnahmekurve für Rubidium in isolierte Langerhanssche Inseln mit RSA 5 %. im Hauptinkubationsmedium	113
3.3.14	Versuche zur Insulinsekretion	117
3.4	Versuche zur Messung des Rubidiumeffluxes	120
3.4.1	Bestimmung des Rubidiums im Effluxmedium (= Aussenmethode)	121
3.4.1.1	Ausgangssituation	121
3.4.1.2	Messung des Rubidiumeffluxes aus Langerhansschen Inseln nur mit Nylonnetz	124

3.4.1.3	Bestimmung des 86-Rubidiumeffluxes mit Leernetzen	126
3.4.1.4	Vergleich zwischen Hyaminhydroxid und Gewebelöser Riedel-de Haen	127
3.4.1.5	Messung des Rubidiumeffluxes aus Langerhansschen Inseln	128
3.4.1.6	Messung des 86-Rubidiumeffluxes aus Langerhansschen Inseln mit der Außenmethode. Untersuchung von Glucose 3 mM und Glucose 16,7 mM	129
3.4.2	Bestimmung des 86-Rubidiumeffluxes aus Langerhansschen Inseln mit der Innenmethode. Untersuchung von Glucose 3 mM und Glucose 16,7 mM	130
3.4.3	Bestimmung des 86-Rubidiumeffluxes aus Langerhansschen Inseln mit einer kombinierten Innen- und Außenmessung. Effekt von Glucose 3 mM und Glucose 16,7 mM	132
3.4.4	Betrachtung der Statikmessung	135
3.4.5	Einführung einer Perifusionsmethode	136
3.4.5.1	Überprüfung des Systems	136
3.4.5.2	Beeinflussung der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Bestimmung der 86-Rubidiumeffluxrate isolierter Langerhansscher Inseln (Perifusion) durch Anwesenheit von exokrinem Gewebe	140
3.5	Ergebnisse	148
3.5.1	Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen auf den 86-Rubidiumefflux aus Langerhansschen Inseln	148
3.5.2	Einfluß von Streptozocin auf den 86-Rubidiumefflux aus Langerhansschen Inseln in Anwesenheit von Glucose 5,6 mM	156
3.5.3	Einfluß von exogenem Insulin auf den 86-Rubidiumefflux aus Langerhansschen Inseln in Anwesenheit von Glucose 5,6 mM	163
3.5.4	Einfluß von exogenem Insulin auf den 86-Rubidiumefflux aus Langerhansschen Inseln in Anwesenheit von Glucose 16,7 mM	168

4.	DISKUSSION	176
4.1	Bedeutung von Rinderserumalbumin für die Funktionsfähigkeit der Langerhansschen Insel	176
4.2	Bestimmung des 86-Rubidiumeffluxes aus isolierten Langerhansschen Inseln. Vergleich: Statikmessung und Perifusionsmethode	180
4.3	Einfluß von Glucose auf die Kaliumpermeabilität Langerhansscher Inseln	183
4.4	Redoxsystem der ß-Zelle und seine Bedeutung für die Kaliumpermeabilität	188
4.4.1	Streptozocin	191
4.4.2	Exogenes Insulin	193
5.	ZUSAMMENFASSUNG	204
5.1	Fragestellung	204
5.2	Ergebnisse im methodischen Teil	205
5.3	Versuchsergebnisse	205
5.4	Schlußfolgerungen	207
	LITERATURVERZEICHNIS	209

1. E I N L E I T U N G

1.1 Stand der Forschung

1.1.1 Glucoseinduzierte Insulinsekretion

Der Stand der Forschung über den Mechanismus der Insulinsekretion vom Glucosereiz bis hin zur Exocytose wurde von Ashcroft, 1980 und nahezu zum gleichen Zeitpunkt von Hedeskov, 1980 in Übersichtsarbeiten zusammengefaßt. Zwei Schemata von Ashcroft sollen dabei einen Überblick über das 'Stimulus-secretion coupling' geben (Abbildungen 1 und 2).

Obwohl ein gewisser direkter Effekt von Glucose oder auch anderer Stimulatoren der Insulinsekretion wie Mannose oder Glycerinaldehyd auf die ß-Zellmembran nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, scheint der hauptsächliche Effekt von Glucose hinsichtlich der insulinfreisetzenden Wirkung aber auch hinsichtlich der Stimulation der Insulinbiosynthese über eine Metabolisierung des Glucosemoleküls in der ß-Zelle vermittelt zu werden. Besondere Bedeutung für die Bereitstellung eines Triggermoleküls für die Insulinsekretion kommt dabei wahrscheinlich den Stufen zwischen Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat zu.

Eine Glucosekonzentrationserhöhung im Medium wird vom Hexokinase- bzw. dem Glucokinasesystem der ß-Zelle wahrgenommen. Dies

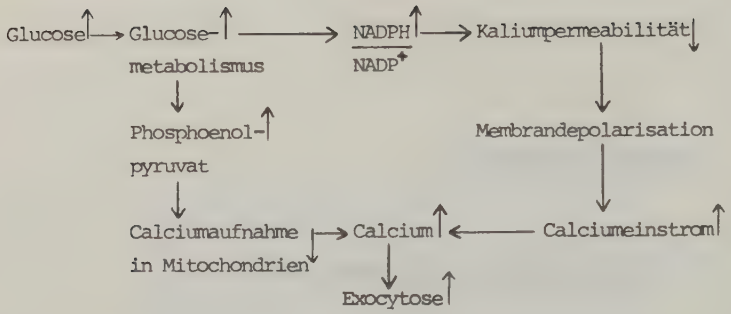


Abb. 1: 'Stimulus-secretion coupling'
Schematische Darstellung der Stoffwechseländerungen in der ß-Zelle. (Ashcroft, 1980)

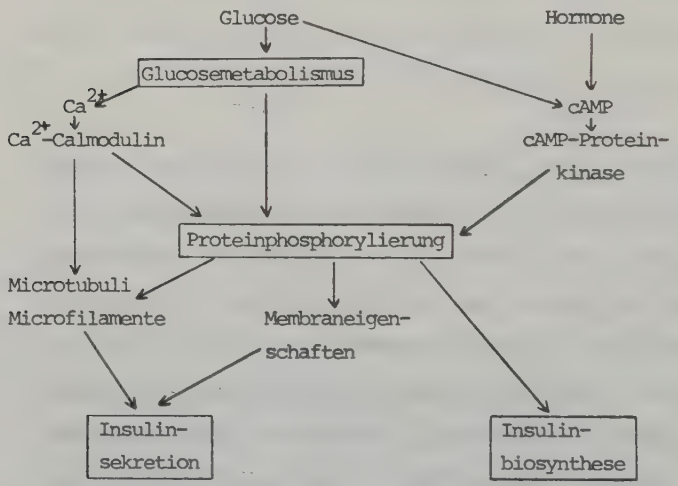


Abb. 2: Schematische Darstellung der Vorgänge bei der glucoseinduzierten Sekretion und Biosynthese von Insulin. (Ashcroft, 1980)

führt zu einer Steigerung des Glucosemetabolismus, was eine Verschiebung des Redoxzustandes der zellulären Pyridinnukleotide in Richtung der reduzierten Seite zur Folge hat. Nach Ashcroft kommt es durch Erhöhung des NADPH/NADP-Quotienten in der ß-Zelle zur Änderung von Membraneigenschaften, woraus eine Verminderung der Kaliumpermeabilität resultiert (evtl. wird aber auch die Permeabilität für andere Ionen, wie z.B. Chlorid oder Phosphat, beeinflußt). Die Membran depolarisiert, und sowie ein bestimmtes Schwellenpotential erreicht ist, werden spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet, und es erfolgt ein massiver Calciumioneneinstrom in die ß-Zelle (Abbildung 1). Die dadurch erhöhte Calciumionenkonzentration im Cytosol beeinflußt einmal direkt den Vorgang der Exocytose, andererseits wird durch Calciumionen die Adenylatzyklase stimuliert, die die vermehrte Bildung von cAMP vermittelt. Auch Phosphoenolpyruvat, das aus dem glykolytischen Abbau der Glucose hervorgeht, trägt zur Aufrechterhaltung bzw. Erhöhung des cAMP-Gehaltes in der Zelle bei, indem es ebenso die Adenylatzyklase aktiviert. Cyclisches AMP wiederum begünstigt eine hohe Calciumionenkonzentration im Cytoplasma dadurch, daß es die Aufnahme von Calciumionen in Mikrosomen hemmt. Gleichzeitig greift auch Phosphoenolpyruvat in diesen Mechanismus ein, indem die Aufnahme von Calciumionen in Mitochondrien vermindert wird.

Erhöhte Calciumionenkonzentration und erhöhter cAMP-Spiegel im Cytoplasma, zwei Parameter, die in enger Wechselbeziehung zueinander stehen (s.o.), spielen die zentrale Rolle für die intrazelluläre Weiterverarbeitung eines Stimulusreizes bis hin zur

Insulinsekretion einerseits und Neusynthese von Insulin andererseits.

Reaktionspartner für Calciumionen im Cytosol stellt das Protein Calmodulin dar, für cAMP auf der anderen Seite ist dies die cAMP-Proteinkinase.
Diese beiden - durch Calcium bzw. cAMP nun aktivierten - Proteine besitzen eine gemeinsame Funktion: die der Proteinphosphorylierung und damit Aktivierung verschiedener Enzyme innerhalb des Sekretions- bzw. Biosyntheseweges, z.B. wie oben geschildert die Wechselbeziehungen zwischen Calcium und cAMP.
Phosphorylierung von Membranproteinen verändert deren Eigenschaften derart, daß eine Verschmelzung von Insulingranula mit der Zellmembran erleichtert wird, weiterhin wird - vor allem durch Ca-Calmodulin - das 'Zellskelett' aus Microtubuli und Microfilamenten aktiviert, das für eine Bewegung der Speichergranula in Richtung Zellmembran verantwortlich ist (Abbildung 2).
Die freie Calciumionenkonzentration im Cytoplasma korreliert direkt mit der Menge sezernierten Insulins, und ein feinabgestimmtes und äußerst spezifisches Verteilungsmuster von Calcium innerhalb der ß-Zelle, reguliert über den Glucosemetabolismus, scheint von größter Bedeutung für ein voll funktionierendes Sekretionssystem zu sein.

1.1.2 Kaliumpermeabilität und Insulinsekretion

Der Veränderung der Kaliumpermeabilität bzw. der daraus resultierenden Membranpotentialänderung und Depolarisation der Membran wird eine bedeutende Rolle im Mechanismus der Sekretion von Insulin zugesprochen.
Besonderes Interesse gilt diesem Parameter, da mit Hilfe von Untersuchungen der Kaliumfluxe die bis heute noch ungeklärte Verbindung (missing link) zwischen Glucosemetabolismus einerseits und den Ionenfluxen bzw. Membranereignissen andererseits hergestellt werden soll.

1. Kaliumpermeabilität und Membranpotential

Nach dem Schema von Ashcroft (Abbildung 1) führt eine Erhöhung der Glucosekonzentration über eine Verschiebung des NADPH/NADP-Quotienten in der ß-Zelle zur Änderung der Kaliumpermeabilität und nachfolgend zu einer Depolarisation der Zellmembran.
Wie in Nerven- oder Muskelzellen, erregbaren Geweben also (Hodgkin, 1951), im Unterschied aber zu anderen Drüsenzellen (Petersen, 1976), so ist auch in der ß-Zelle der Langerhansschen Insel das Ruhepotential ein Kaliumdiffusionspotential, d.h. es wird weitgehend bestimmt von den unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen intra- bzw. extrazellulär (Meissner et al., 1978). Dieses Ruhepotential beträgt bei der ß-Zelle - gemessen mit der Mikroelektrodentechnik - -46,8 mV in Abwesenheit von Glucose (Meissner et al., 1978).

Daß die Änderung des Ruhepotentials und die Ausbildung eines Aktionspotentials zunächst einmal nicht die Folge einer erhöhten Permeabilität der Membran für Ionen ist - wie z.B. am Nerv, wo das Aktionspotential durch einen massiven Natriumioneneinstrom in die Zelle ausgebildet wird -, sondern auf eine Verminderung der Membrandurchlässigkeit zurückzuführen ist, konnte von mehreren Autoren gezeigt werden:
Atwater et al., 1978 wiesen nach, daß die durch Glucose hervorgerufene Depolarisation mit einer Erhöhung des Membranwiderstandes einhergeht, auch ist die erste auftretende Depolarisation nicht durch Entfernung von Natriumionen aus dem Medium oder durch Zusatz von Cobalt, einem spezifischen Calciumkanalblocker, hemmbar (Meissner und Preissler, 1979). Des weiteren hemmt Glucose in der gleichen Konzentrationsabhängigkeit den Kaliumefflux wie auch die Depolarisation gefördert wird; Stoffe, die den Kaliumefflux vergrößern, wie z.B. Valinomycin, hyperpolarisieren auch die Zellmembran (Henquin und Meissner, 1978), während Stoffe, die den Kaliumefflux aus Langerhansschen Inseln hemmen (wie Quinin oder 9-Aminoacridin), die Zellmembran depolarisieren (Meissner und Preissler, 1979).
Trotz dieser Vielzahl von Hinweisen kann eine Beteiligung anderer Ionen, wie z.B. Chlorid (Sehlin, 1978) oder Phosphat (Freinkel et al., 1974), deren Efflux aus der Zelle durch Glucosekonzentrationserhöhung gesteigert wird, an der Depolarisation der ß-Zelle nicht ausgeschlossen werden.

Wie oben erwähnt, beträgt das Ruhepotential der ß-Zelle in Abwesenheit von Glucose -46,8 mV. Erhöhung der Glucosekonzentra-

tion auf ca. 6 mM, einer Konzentration, bei der das Maximum des Hemmeffektes auf die Kaliumpermeabilität bereits erreicht ist, führt zu einer Veränderung des Potentials um ca. 2 mV auf -44,7 mV (Dean und Matthews, 1970a,b, sowie mit verbesserter Methode Meissner et al., 1978).

Ist dieses Potential, das sogenannte Schwellenpotential, erreicht, kommt es zur raschen Depolarisation auf ca. -33,9 mV, dem Plateaupotential. Diese rasche und im Vergleich zum vorherigen Schritt sehr hohe Änderung ist auf die Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle zurückzuführen und einen dadurch erfolgten massiven Einstrom von Calciumionen in das Zellinnere. Weitere Erhöhung der Glucosekonzentration im Medium führt nicht zu einer Änderung des Ruhe-, Schwellen- oder Plateaupotentials, es ändert sich lediglich die Zeitdauer, während der die Zelle auf dem Plateaupotential verbleibt, dem sogenannte Spikes - d.h. weitere kleine und kurzdauernde Potentialänderungen - aufgelagert sind (Meissner, 1976). Die Dauer dieser Plateaupotentialphasen = Burstlänge ist mit der Menge an sezerniertem Insulin direkt korrelierbar. Bei sehr hohen Glucosekonzentrationen >> 16,7 mM, bei ca. 27 mM Glucose, erfolgt eine Dauerdepolarisation der Zelle und die ansonsten rhythmisch verlaufenden Phasen der Depolarisation und anschließender Repolarisation gehen verloren (Abbildung 3).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Hemmung der Kaliumpermeabilität quantitativ betrachtet einen verschwindend geringen, aber sehr wichtigen Beitrag zur Änderung des Membranpotentials liefert, nämlich den Schritt vom Ruhepotential bis

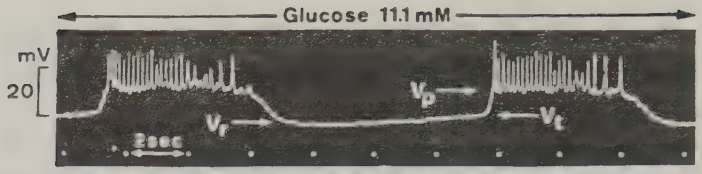


Abb. 3a: Durch Glucose 11.1 mM hervorgerufene elektrische Aktivität einer einzelnen ß-Zelle. (Meissner, 1976)

V_r = Ruhepotential

V_t = Schwellenpotential

V_p = Plateaupotential

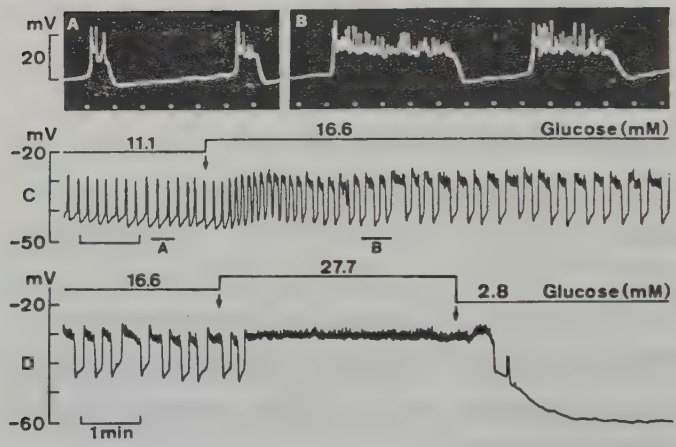


Abb. 3b: Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen auf die elektrische Aktivität einer einzelnen ß-Zelle.

Die Oszilloskopdarstellungen A und B entsprechen den in der Schreiberaufzeichnung C gekennzeichneten Intervallen. (Meissner, 1976)

zum Schwellenpotential. Für die anschließende Depolarisation spielt die Änderung der Kaliumpermeabilität der Zellmembran dann keine Rolle mehr.

2. 86-Rubidium als Tracer für Kalium

Die meisten Untersuchungen, die Aufschluß über Kaliumfluxe der Langerhansschen Insel geben sollen, werden mit 86-Rb als Tracer für Kalium durchgeführt. Dieser Umstand ist durch die gute Bestimmbarkeit des 86-Rb im Vergleich mit Kaliumionen begründet. Zwar steht auch ein radioaktives Isotop des Kalium zur Verfügung, der Nachteil dieses Nuklids 42-K ist aber in der sehr kurzen Halbwertszeit von 12,36 Stunden zu sehen (Henquin, 1980).

Daß 86-Rb als Stellvertreter für Kalium verwendet werden kann, wurde von mehreren Autoren bestätigt:

Bedingt durch die sehr ähnlichen Ionenradien von Kalium 0,266 nm gegenüber Rubidium 0,296 nm (Henquin, 1980) findet man in Lösung nahezu gleiche Diffusionskoeffizienten dieser beiden Ionen (Robinson und Stokes, 1969).

Bonting konnte 1970 zeigen, daß 86-Rb in vielen Geweben das Kaliumion in der Na/K-ATPase ersetzen kann.

Generelle Einschränkungen aber müssen dahingehend gemacht werden, daß 86-Rb in qualitativer Hinsicht gesehen Kalium zwar durchaus ersetzen kann, quantitative Aussagen über Kaliumfluxe und Kaliumgehalt der Langerhansschen Insel mit dieser Methodik nicht gemacht werden können (Henquin, 1980).

Malaisse et al., 1978 wiesen nach, daß nach 90-minütiger Inkubation mit äquimolaren Mengen an 86-Rb oder 42-K in Abwesenheit von Glucose der 86-Rubidiumgehalt isolierter Langerhansscher Inseln 268 pmol 86-Rb/Insel gegenüber einem Gehalt von 161 pmol 42-K/Insel beträgt. Ebenso konnten Unterschiede in der Effluxrate der beiden Ionen festgestellt werden. So beträgt die Effluxrate von 42-K 8,88 %/min, von 86-Rb jedoch nur 5,54 %/min, dadurch wird bei Bestimmung der Kaliumeffluxrate mit 86-Rubidium die tatsächliche Effluxrate unterschätzt (Malaisse et al., 1978).

Übereinstimmung besteht für den Parameter der Influx/Efflux-Rate (= fractional turnover rate), die 14,8 pmol/Insel/Minute für 86-Rb und 14,3 pmol/Insel/Minute für 42-K beträgt (Malaisse et al., 1978).

Hinsichtlich des Verhaltens der Fluxraten der beiden Isotope unter verschiedenen Bedingungen, z.B. verschiedenen Glucosekonzentrationen, kann gesagt werden, daß hier unabhängig von der Glucosekonzentration im Medium der Quotient der Effluxraten von Rubidium und Kalium immer 0,87 beträgt, d.h. beide Ionen ändern auf Glucosereiz hin ihre Effluxraten in gleichem Ausmaß (Henquin, 1980).

Von Boschero und Malaisse, 1979 wird dieser Quotient mit 0,64 angegeben, sowohl in An- wie auch in Abwesenheit von Glucose.

3. Aufnahme von Kalium in die Langerhanssche Insel

Die Aufnahme von Kaliumionen in die ß-Zelle wird von einer membranständigen Na/K-ATPase vermittelt (Sehlin und Täljedal, 1974).
Die Energieabhängigkeit des Aufnahmeprozesses von Kalium in die Langerhanssche Insel wurde von Idahl et al., 1978 bestätigt, die eine direkte Korrelation zwischen aufgenommenem 86-Rubidium und ATP-Gehalt der Insel bei ob/ob Mäusen feststellten.
Die Kaliumaufnahme in die Langerhanssche Insel, d.h. die Funktion der ATP-abhängigen Na/K-Pumpe, kann durch Ouabain gehemmt werden. Ebenso führt Entfernung von Natriumionen aus dem Medium zum Verlust der Fähigkeit der Insel, Rubidium akkumulieren zu können (Sehlin und Täljedal, 1974; Malaisse et al., 1978). Auch Absenkung der Temperatur beeinflußt den Transportvorgang negativ (Frankel et al., 1978).

Die Kaliumaufnahme in die Langerhanssche Insel ist von der Glucosekonzentration im Medium unabhängig, denn Änderung der Glucosekonzentration hat keine Auswirkung auf die Funktion und Aktivität der Na/K-ATPase (Sehlin und Täljedal, 1974).
Die Halbwertszeit bis zum Erreichen des Equilibriums wird von Sehlin und Täljedal, 1974 mit 25 Minuten angegeben; Boschero et al., 1977 konnten zeigen, daß die 42-Kaliumaufnahme nach 90 Minuten ihr steady-state-Gleichgewicht erreicht hat, es wurde keine weitere Steigerung der Aufnahme in die Langerhanssche Insel nach 120 Minuten Inkubationsdauer gefunden.

4. Kaliumgehalt der Langerhansschen Insel

86-Rubidium kann in Langerhansschen Inseln von ob/ob Mäusen mehr als 40-fach gegenüber der Konzentration im Außenmedium angereichert werden. So fanden Sehlin und Täljedal, 1974 bei einer Mediumskonzentration des 86-Rb von 0,07 mM in den Langerhansschen Inseln einen Gehalt von 3,7 mmol/kg Trockengewicht, was bei einem Zellwassergehalt von 1,2 l/kg Trockengewicht einer Konzentration von 3,1 mM entspricht. Auch Lernmark, der eine ß-Zellsuspension untersuchte, konnte dort eine ungefähr 30-fache Anreicherung des 86-Rb gegenüber der Konzentration im Außenmedium feststellen (Lernmark et al., 1975).
Absolute Zahlenwerte werden z.B. von Malaisse et al., 1978 angegeben, die in Abwesenheit von Glucose einen durchschnittlichen 42-Kaliumgehalt der Langerhansschen Insel mit 161 pmol/Insel finden, in Anwesenheit von Glucose 16,7 mM einen Gehalt von 312 pmol/Insel. Für 86-Rubidium findet man in derselben Arbeit die Angabe von 268 pmol 86-Rb/Insel in Abwesenheit von Glucose.
Vom gleichen Autor werden in einer anderen Arbeit 121 pmol 42-K/Insel und 246 pmol 42-K/Insel in Abwesenheit bzw. in Anwesenheit von Glucose 16,7 mM angegeben (Malaisse et al., 1978a). Obwohl, wie oben beschrieben, Glucose die Rubidium- bzw. Kaliumaufnahme in Langerhanssche Inseln nicht beeinflußt, wird dennoch bei Inkubation in Anwesenheit höherer Glucosekonzentrationen eine Steigerung der Nettoaufnahme der beiden Isotope ge-

funden. Dies ist auf die Hemmwirkung von Glucose auf den Rubidium- bzw. Kaliumefflux zurückzuführen (Sehlin und Täljedal, 1974; Henquin, 1978).

5. Kaliumefflux aus der Langerhansschen Insel

Im Unterschied zur Aufnahme von Kalium in die Langerhanssche Insel erfolgt der Efflux aus der Insel passiv durch Diffusion. Daß der Efflux keinen aktiven, energieverbrauchenden Vorgang darstellen kann, wird dadurch gesichert, daß Ouabain praktisch keinen Einfluß auf die Effluxrate von 86-Rubidium aus Langerhansschen Inseln hat (Malaisse et al., 1978), ebenso führt die Entfernung von Natriumionen aus dem Medium zu keiner Änderung des 86-Rubidiumeffluxes (Sehlin und Täljedal, 1974).
Sehlin gibt an, daß die Abgabekinetik von 86-Rb aus zuvor mit diesem Isotop beladenen Inseln einer Exponentialkurve gleicht mit einer Halbwertszeit von ca. 16 Minuten (Sehlin und Täljedal, 1974). Henquin engt diese Feststellung dahingehend ein, daß nur in Anwesenheit von Glucose im Medium eine einer Exponentialfunktion gleichenden Abgabekinetik erreicht wird (Henquin et al., 1979; Henquin, 1980).
Malaisse et al., 1978 beschreiben die Effluxkinetik mit folgender Gleichung:

$$E^* = E^*_o \times e^{-Ft}$$

E^* = ausfließende Radioaktivität
E^*_o = Radioaktivität zu Beginn des Effluxes in der Insel
F = Influx/Efflux-Rate (fractional turnover rate)
t = Zeit

Stabile Effluxraten werden erzielt, wenn mindestens eine Glucosekonzentration von > 5 - 6 mM im Medium vorhanden ist (Henquin, 1980). Für 86-Rubidium werden solche Effluxraten angegeben, die von der Glucosekonzentration abhängig sind, und zwar werden 5,54 %/Minute in Abwesenheit von Glucose, 3,64 %/Minute bei 2,8 mM Glucose und 2,86 %/Minute in Anwesenheit von 16,7 mM Glucose gefunden, d.h. Erhöhung der Glucosekonzentration vermindert die 86-Rubidiumeffluxrate aus zuvor mit dem Isotop beladenen Inseln (Malaisse et al., 1978).
Änderungen des pH-Wertes in der ß-Zelle oder im Außenmedium haben praktisch keinen Einfluß auf den 86-Rubidiumefflux (Carpinelli und Malaisse, 1980; Henquin, 1981). Ebenso spielt eine Veränderung im cAMP-Gehalt der Insel für die Regulation des Rubidiumeffluxes keine Rolle (Carpinelli und Malaisse, 1980a).

6. Glucose und Kaliumpermeabilität

Der Hemmeffekt von Glucose auf die Kaliumpermeabilität Langerhansscher Inseln ist in einem bestimmten Bereich von der Glucosekonzentration abhängig. Schon eine so geringe Konzentration wie 3 mM bewirkt eine Hemmung des Kaliumeffluxes (Henquin, 1980). Der Maximaleffekt wird von Henquin, 1980 mit einer Konzentration von 5 - 6 mM, von Carpinelli und Malaisse, 1981 mit 8,3 mM Glucose im Medium angegeben. Diese beobachteten Hemmeffekte sind bei Verminderung der Glucosekonzentration sehr schnell reversibel (Henquin, 1980).

Eine Erhöhung der Glucosekonzentration über diesen angegebenen Schwellenwert hinaus hat keine weitere Verminderung der Kaliumpermeabilität zur Folge, sondern führt umgekehrt zu einer leichten Erhöhung der Effluxrate (Carpinelli und Malaisse, 1981). Dieser Effekt wird dadurch erklärt (Lebrun et al., 1982), daß nach Überschreiten der Schwellenkonzentration von Glucose - oberhalb derer Membrandepolarisation zum Aktionspotential (Meissner und Schmelz, 1974), aktive Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel durch spannungsabhängige Calciumkanäle (Hellman et al., 1976) und Insulinsekretion (Ashcroft et al., 1972) beobachtet werden können - durch die Erhöhung der cytosolischen Calciumionenkonzentration ein calciumsensitiver Kaliumefflux stattfindet.

Unterstützt wird diese Beobachtung durch die Tatsache, daß einmal bei Entfernung von Calciumionen aus dem Medium diese Erhöhung des Effluxes unterbleibt (Carpinelli und Malaisse, 1981; Lebrun et al., 1981) und weiterhin, daß dieser Effekt durch Erhöhung der Calciumionenkonzentration im Medium (ohne Veränderung der Glucosekonzentration) von 0,5 mM auf 10 mM erzielt werden kann (Henquin, 1979).

Dieser 'transient increase' der Kaliumpermeabilität ist kein Phänomen, das alleine für Glucose Gültigkeit besitzt, auch erfolgt z.B. nach Zusatz von Tolbutamid zu einem Medium mit 8,3 mM Glucose eine Erhöhung der 86-Rubidiumeffluxrate (Henquin, 1980b). Auch nach Zugabe von Theophyllin 2 mM zu einem durch 7 mM Glucose bereits gehemmten System kann dieser Effekt beobachtet werden (Henquin, 1980a).

Zeitlich gesehen muß der Effekt von Glucose auf die Kaliumpermeabilität vor den Influx von Calciumionen in die Langerhanssche Insel gestellt werden; dies wird durch mehrere Untersuchungen bestätigt:

Erste Hinweise ergeben sich aus der Tatsache, daß für den Einfluß von Glucose auf die Kaliumpermeabilität die Anwesenheit von Calciumionen im Medium nicht erforderlich ist, auch auf Natriumionen im Außenmedium kann verzichtet werden, wohingegen für die Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel wegen des Natrium-Calcium-Countertransportes die Anwesenheit von Natriumionen im Medium notwendig ist (Sehlin und Täljedal, 1974; Boschero und Malaisse, 1979).

Des weiteren konnte in kinetischen Untersuchungen zum zeitlichen Ablauf der Änderungen der Ionenfluxe nach Glucosestimulation von Malaisse und Mitarbeitern gezeigt werden, daß der Hemmeffekt von Glucose auf die Kaliumpermeabilität schon nach 1 Minute sichtbar ist, halbmaximaler Effekt zwischen 85 und 96 Sekunden und maximaler Hemmeffekt bereits 157 - 168 Sekunden nach Zuschalten der höheren Glucosekonzentration auftritt. Diese zeitliche Abfolge stimmt mit der schnellen Hemmung, die Glucose auf den Calciumefflux ausübt, genau überein:

Ein Anstieg des Calciumeffluxes, der die durch Glucose stimulierte Calciumaufnahme in die ß-Zelle widerspiegelt (Herchuelz et al., 1980), ist zeitlich nach der Hemmung der Kaliumpermeabilität zu suchen und zwar setzt dieser Calciumefflux 157 - 168 Sekunden nach Umschalten auf höhere Glucosekonzentration ein, erreicht halbmaximalen Effekt nach 229 - 240 Sekunden und ist maximal nach 277 - 294 Sekunden (Malaisse et al., 1981).

Daß eine Hemmung der Kaliumpermeabilität für sich allein kein ausreichendes Signal für die Insulinsekretion darstellt, konnte von Henquin, 1977 gezeigt werden. In Anwesenheit von 2 mM Glucose hemmt zwar Tetraethylammonium 20 mM den 86-Rubidiumefflux genauso stark wie 6 mM Glucose - eine Konzentration, die bereits eine aktive Insulinsekretion auslöst -, hat aber keine Insulinsekretion zur Folge. Gleichwohl ist Tetraethylammonium in der Lage, die durch Glucose 6 mM hervorgerufene Insulinsekretion zu potenzieren.

7. Glucosemetabolismus und Kaliumpermeabilität

Der Metabolisierung von Glucose und anderer Stimulatoren der Insulinsekretion in der ß-Zelle kommt die entscheidende Funktion für die Auslösung der Sekretion und auch der Biosynthese von Insulin zu.

Nur Kohlenhydrate zum Beispiel, die in der ß-Zelle verstoffwechselt werden, wie D-Glucose, Mannose, N-Acetylglucosamin, sind in der Lage, die Langerhanssche Insel zur Insulinsekretion anzuregen, wohingegen bei Kohlenhydraten, die nicht metabolisiert werden, wie Galactose, Allose, Arabinose, Ribose, keine Stimulation der Insulinsekretion festgestellt werden kann (Ashcroft et al., 1972, 1973; Hellman et al., 1973).

Viele metabolische Parameter, wie Glucoseutilisation (Ashcroft et al., 1972a, 1973), Glucoseoxidation, Inselgehalt an Glucose-

6-phosphat (Ashcroft et al., 1970), Lactatbildung (Matschinsky und Ellermann, 1973; Pace et al., 1975) und Sauerstoffverbrauch (Hellerström und Gunnarsson, 1970), weisen die gleiche Glucosekonzentrationsabhängigkeit auf wie die Insulinsekretion.

Auch für die Änderung der Kaliumpermeabilität ist die Verstoffwechselung der verschiedenen Stimulatoren Voraussetzung. So hemmen nur Kohlenhydrate, die in der ß-Zelle metabolisiert werden (s.o.), den 86-Rubidiumefflux aus Langerhansschen Inseln, keinen Einfluß haben dagegen nicht-verstoffwechselte Kohlenhydrate (Henquin, 1980).
Wird der Glucoseabbau in der ß-Zelle durch spezifische Inhibitoren gehemmt, kann keine Änderung der Kaliumpermeabilität auf Glucosezusatz hin festgestellt werden:

Mannoheptulose und Glucosamin, Hemmstoffe der Glucokinase (Ashcroft und Randle, 1970; Malaisse et al., 1968), vermindern die glucoseinduzierte Insulinsekretion (Ashcroft et al., 1973). Mannoheptulose verhindert die Verminderung der Kaliumpermeabilität durch Glucose, Glucosamin erhöht die durch Glucose erniedrigte 86-Rubidiumeffluxrate (Henquin, 1980a).

2-Deoxy-D-Glucose verringert die Umwandlung von Glucose-6-phosphat zu Fructose-6-phosphat, erhöht reversibel die 86-Rubidiumeffluxrate und hemmt die glucoseinduzierte Insulinsekretion (Henquin, 1980a).

Iodacetat, ein weiterer Hemmstoff der Glykolyse, der mit dem Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase interferiert (Zawalich et al., 1977), verhindert die Kaliumpermeabilitätshem-

mung durch Glucose (Henquin, 1980a) und hemmt die glucoseinduzierte Insulinsekretion (Ashcroft und Randle, 1975).

Glycerinaldehyd vermindert den 86-Rubidiumefflux aus Langerhansschen Inseln (Henquin, 1980a) und bewirkt ebenso wie Glucose eine biphasische Insulinsekretion (Ashcroft et al., 1973). Da Glycerinaldehyd, der in der ß-Zelle metabolisiert wird (Malaisse et al., 1974), in den Glykolyseweg auf der Triosephosphatstufe eintritt, können 2 Forderungen gestellt werden:

1. Mannoheptulose darf die durch Glycerinaldehyd ausgelöste Hemmung der Kaliumpermeabilität und auch die Insulinsekretion nicht hemmen. Diese Forderung konnte bestätigt werden (Ashcroft et al., 1973; Hellman et al., 1974; Henquin, 1980a).

2. Das für die Auslösung der Insulinsekretion verantwortliche Agens muß auf einer Stufe unterhalb des Triosephosphatlevels gesucht werden.

Alle diese Befunde werden durch Untersuchungen des Membranpotentials bestätigt (Dean et al., 1975).

8. Thiole und Kaliumpermeabilität

Die Vermittlerrolle zwischen metabolischen Ereignissen einerseits und Änderung von Membraneigenschaften, d.h. Beeinflussung von Ionenfluxen, andererseits, kommt den Redoxpaaren NADH/NAD aus dem glykolytischen Abbau von Glucose und dem aus dem Pento-

sephosphatshunt stammenden NADPH/NADP zu, wobei Erhöhung der Glucosekonzentration zu einer Verschiebung des Redoxgleichgewichtes zur reduzierten Seite hin führt (Panten et al., 1973). Dabei wurde festgestellt, daß die cytosolische NADPH/NADP-Ratio nach Steigerung der Glucosekonzentration von 2 mM auf 20 mM wesentlich mehr ansteigt als das Gesamtnukleotidverhältnis, was auf eine wichtige Rolle des Redoxpaares NADPH/NADP - und damit des Pentosephosphatshunts - für die glucoseinduzierte Insulinsekretion schließen läßt (Ammon und Verspohl, 1976; Sener et al., 1978; Malaisse et al., 1979; Verspohl et al., 1979; Ashcroft, 1980).

Diese Rolle der reduzierten Pyridinnukleotide wird durch Befunde bestätigt, die zeigen, daß bei Zusatz von NH_4 oder Menadion, Stoffen, die das Redoxgleichgewicht zur oxidierten Seite hin verschieben, die Kaliumpermeabilität gesteigert, sowie die glucoseinduzierte Insulinsekretion gehemmt wird (Malaisse et al., 1978a; Sener et al., 1978).
Reduktion der Pyridinnukleotide durch Substanzen, wie z.B. Pentobarbital, dagegen führt zur Hemmung der Kaliumpermeabilität (Panten et al., 1973; Henquin, 1980a).

Denkbar wäre ein direkter Einfluß der reduzierten Pyridinnukleotide auf Kaliumkanäle der Membran, deren Öffnungszustand sie regulieren, oder aber, wie von Hellman et al., 1974 vorgeschlagen, eine Übertragung der Reduktionsäquivalente von NADPH auf ein weiteres Redoxpaar, dem GSH/GSSG-System, das seinerseits mit einem membranständigen Thiol-Disulfid-System gekoppelt ist, das dann die Membranpermeabilität für Ionen reguliert.

Für eine Beteiligung des GSH/GSSG-Systems am Mechanismus der Insulinsekretion sprechen folgende Befunde:

1. Langerhanssche Inseln weisen eine hohe Konzentration von GSH (Havu, 1969) sowie eine hohe Glutathionreductase-Aktivität auf. Ein wichtiges Cosubstrat für dieses Enzym stellt NADPH dar (Berne, 1975).

2. Durch den Redoxzustand des GSH/GSSG-Systems in der Zelle wird - wie an verschiedenen Organen gezeigt werden konnte - der Redoxzustand von Thiolgruppen in der Membran beeinflußt (Rink, 1974; Ammon et al., 1983).

3. Glucose führt konzentrationsabhängig zu einer Erhöhung des GSH/GSSG-Quotienten (Ammon et al., 1979).

4. Stoffe, die den GSH/GSSG-Quotienten senken, wie Diamid oder Methylenblau, hemmen auch die glucoseinduzierte Insulinsekretion (Ammon et al., 1979).

5. Tertiäres Butylhydroperoxid, eine Substanz, die als Substrat der Glutathionperoxidase wirkt und damit indirekt zur Senkung des intrazellulären GSH-Spiegels führt, erniedrigt den GSH/GSSG-Quotienten und hemmt die glucoseinduzierte Insulinsekretion (Ammon et al., 1979).

6. Durch Zusatz von exogenem Glutathion (GSH) kann die glucoseinduzierte Insulinsekretion gesteigert werden (Ammon und Abdel-Hamid, 1981).

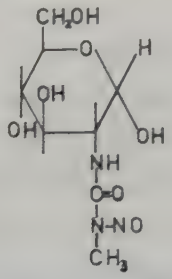
Auch die Kaliumpermeabilität Langerhansscher Inseln scheint durch den Redoxzustand des GSH/GSSG-Systems beeinflußbar zu sein:
So konnte Henquin, 1980a nach Zusatz von tertiärem Butylhydroperoxid 0,2 mM und Methylenblau 10 µM eine Erhöhung, nach Zusatz von GSH 10 mM eine leichte Verminderung der 86-Rubidiumefffluxrate feststellen.

Die bisherigen Befunde lassen den Schluß zu, daß - wie von Ammon et al., 1980 vorgeschlagen - der Redoxstatus des GSH/GSSG-Systems einen modulierenden Einfluß auf die Insulinsekretion ausübt.
Ungeklärt ist allerdings die Frage der genauen Lokalisation des Wirkortes des GSH/GSSG-Redoxpaares im 'Stimulus-secretion coupling'.
Zwar konnte von Ammon et al., 1983 eine Beziehung zwischen GSH/GSSG-Quotient und der 45-Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel gezeigt werden, ob das Glutathionsystem aber schon auf früher liegende Schritte des Sekretionsmechanismusses einwirkt, ist noch unklar.
Einerseits wird von Ashcroft, 1980 die Ansicht vertreten, daß Redoxäquivalente und damit auch GSH bereits für die Veränderung der Kaliumpermeabilität eine Rolle spielen, diesem Vorschlag steht allerdings die Tatsache entgegen, daß der intrazelluläre GSH/GSSG-Quotient erst merklich durch Glucosekonzentrationen > 5,6 mM (dem Endpunkt der Kaliumpermeabilitätshemmung) verändert wird (Ammon et al., 1980).

Auch die Arbeit von Henquin, 1980a läßt keinen eindeutigen Schluß zu, da die von ihm eingesetzten Substanzen in den verwendeten Konzentrationen auch andere Parameter, wie z.B. ATP-Gehalt, der ß-Zelle beeinflussen.

1.1.3 Streptozocin und Insulinsekretion

1956 wurde das Breitbandantibiotikum Streptozocin (2-Deoxy-2-(3-methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose) aus Streptomyces achromogenes var. 128 isoliert, ein Stoff, der chemisch aus den Bausteinen Glucose und 1-Methyl-1-nitrosoharnstoff aufgebaut ist.



Streptozocin $C_{14}H_{27}O_{12}N_5$

Strukturformel

Während der toxikologischen Prüfung der Substanz stellte sich heraus, daß Streptozocin, das auch in der Lage ist, Tumorwachstum zu hemmen (Evans et al., 1965), auf der anderen Seite aber selbst carcinogene Eigenschaften besitzt (Arison und Feudale,

1967; Rakieten et al., 1968), bei mehreren Versuchstieren wie Ratte, Hund (Rakieten et al., 1963; Evans et al., 1965; Arison und Feudale, 1967), Maus, Meerschweinchen (Brosky und Logothetopoulos, 1969), Hamster (Wilander und Boquist, 1972; Chang et al., 1977) sowie Affe und Kaninchen (Pitkin und Reynolds, 1970; Lazarus und Shapiro, 1973) eine Hyperglykämie verursachte, die in nachfolgenden Untersuchungen auf eine irreversible Schädigung der Langerhansschen Inseln des Pankreas zurückgeführt werden konnte (Rakieten et al., 1963).

Nach Behandlung eines Versuchstieres mit Streptozocin werden 3 verschiedene Stadien beschrieben (Junod et al., 1967):

1. Eine Hyperglykämie, deren Maximum ca. 2 Stunden nach Injektion festzustellen ist. Daß diese auftretende Hyperglykämie mit einer eingeschränkten Funktion und damit Sekretionsleistung der ß-Zelle der Langerhansschen Insel einhergeht, zeigen einmal Messungen der Insulinspiegel im Blut, die trotz vorhandener Hyperglykämie nicht ansteigen (Junod et al., 1967), und auch in-vitro-Experimente (Creutzfeld et al., 1969; Golden et al., 1971; Ammon, unveröffentlicht), bei denen eine verminderte Insulinsekretion isolierter Langerhansscher Inseln auf Glucosereiz hin nach Inkubation mit Streptozocin beobachtet wird. Der erhöhte Blutzuckerspiegel ist auf die Wirkung von Streptozocin auf die Leber zurückzuführen. Rerup und Tarding, 1969 zeigten, daß 90 Minuten nach Injektion von Streptozocin (also 30 Minuten vor dem Auftreten des Maximums der Hyperglykämie) ein starker Anstieg im Abbau des Leberglykogens festzustellen ist.

2. Eine hypoglykämische Phase, die nach ungefähr 7 Stunden auftritt. Während dieser Periode werden aus zerstörten ß-Zellen große Mengen an Insulin freigesetzt. So wurden erhöhte Plasmainsulinspiegel kurz vor und während der hypoglykämischen Phase beobachtet, auch kann die Hypoglykämie durch Gabe von Antiinsulinserum abgeschwächt werden (Junod et al., 1967, 1969; Rerup und Tarding, 1969).

3. Nach ca. 24 Stunden manifestiert sich die diabetische Stoffwechsellage, die mit völliger Zerstörung der ß-Zellen des Pankreas einhergeht; gleichzeitig ist eine fortdauernde Hyperglykämie festzustellen. Das Ausmaß der Zerstörung des endokrinen Pankreas ist dabei von der verwendeten Streptozocindosis abhängig (Junod et al., 1967).

Die diabetogenen Effekte, die in vivo oder in vitro beobachtet werden, können durch Gabe von NAD bis zu 2 Stunden nach Zusatz von Streptozocin beeinflußt werden (Schein und Loftus, 1968).

Veränderungen am Glucoseteil des Moleküls, z.B. durch Methylierung, vermindert bzw. beseitigt die diabetogenen Eigenschaften von Streptozocin (Bannister, 1972).
Andererseits ist aber nachgewiesen worden (Gunnarson et al., 1974; Wilander und Gunnarson, 1975), daß der zuckerfreie Anteil des Moleküls, der Methylnitrosoharnstoff (MNU), ebenso, wenn auch in geringerem Maße, diabetogen wirken kann.
Dies könnte in der Tatsache begründet liegen, daß MNU um den

Faktor 3,8 weniger als Streptozocin selbst in die ß-Zelle aufgenommen wird und dort akkumulieren kann (Anderson et al., 1974).

Eine Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedliche Wirksamkeit der beiden Stoffe könnte sein, daß, wie von Karunanayake et al., 1976 vorgeschlagen, der Glucoseteil des Moleküls für die Bindung an die Zellmembran (an Glucoserezeptor oder Carriermolekül) verantwortlich ist, daß aber der diabetogene Effekt durch Hydrolyse und Eindringen von MNU in die Zelle bewirkt wird.

Glucose hätte dann die Bedeutung, daß es durch spezifische Erkennung die Bindung von MNU an Langerhanssche Inseln erhöht und damit die diabetogene Wirkung verstärkt.

Auch nimmt man heute an, daß der Transport von Streptozocin in die ß-Zelle mit Hilfe eines Carriers vollzogen wird; dieser Vorgang kann durch gleichzeitige Gabe von Glucose, Glucosamin oder auch 2-Deoxyglucose teilweise, durch Zusatz von Cytochalasin B ganz unterdrückt werden (Hinz und Pfeiffer, 1974).

Sehr schnell nach Streptozocinzusatz zu isolierten Langerhansschen Inseln treten Veränderungen im Glucosemetabolismus auf. So wird bereits nach 10-minütiger Inkubation eine Verminderung des NAD- sowie auch des ATP-Gehaltes der Insel auf 10 % des Ausgangswertes festgestellt. Gleichzeitig kann eine - im Ausmaß vergleichbare - Hemmung der Glykolyse und der Glucoseoxidation beobachtet werden (Hinz und Pfeiffer, 1974).

Die Veränderungen des NAD-Gehaltes der Zelle - die von der verwendeten Streptozocindosis abhängig sind (Schein et al., 1973)

- können auf einen verstärkten Abbau, nicht auf eine verminderte Synthese, von NAD zurückgeführt werden (Hinz et al., 1973; Yamamoto und Okamoto, 1980), und zwar bewirkt Streptozocin eine Aktivierung der Zellkern-poly(ADP-ribose)synthetase, einem NAD abbauenden Enzym.
Dies beweist die Tatsache, daß verschiedene Hemmstoffe der poly(ADP-ribose)synthetase wie 3-Aminobenzamid, Pyrazinamid, 3-Nitrobenzamid aber auch Methylxanthine dem diabetogenen Effekt von Streptozocin entgegenwirken können (Yamamoto und Okamoto, 1980).

Es scheint allerdings so zu sein, daß nicht NAD bzw. das abbauende Enzym den eigentlichen Angriffsort von Streptozocin in der Zelle darstellen, sondern daß Streptozocin in der ß-Zelle entweder die Konzentration von freien Radikalen erhöht oder aber als Oxidans wirkt und dadurch die Fähigkeit der Zelle mindert, solche Radikale mit Hilfe von Antioxidantien abzufangen (Robbins et al., 1980).
Streptozocin vermittelt seine Wirkung durch Bildung bzw. Hemmung des Abfangprozesses von Radikalen, die zu Veränderungen bzw. Schädigungen der Zell-DNA führen. Es konnte gezeigt werden, daß poly(ADP-ribose)synthetase durch eine geschädigte DNA in ihrer Aktivität gesteigert werden kann. Daraus resultiert die Verminderung des NAD-Gehaltes der Zelle (Okamoto, 1981).

Diese Vermutung über den Wirkungsmechanismus von Streptozocin kann durch mehrere Beobachtungen unterstützt werden:

Streptozocin ist in der Lage, in Erythrocyten das Enzym Super-

oxiddismutase zu hemmen, ein Enzym, das für das Abfangen freier Radikale mitverantwortlich ist (Crouch et al., 1978).
Durch vorherige Gabe von Superoxiddismutase kann die diabetogene Wirkung von Streptozocin abgeschwächt werden (Robbins et al., 1980).
Vom gleichen Autor konnte gezeigt werden, daß Streptozocin den GSH-Pool der ß-Zelle vermindert und dadurch eine Störung des antioxidativen Systems der Zelle hervorruft.
Aus unserem Arbeitskreis liegen Befunde vor (unveröffentlicht), die diese Beobachtung unterstützen. Hier konnte eine Verminderung des NADPH-Pools, der in enger Beziehung zum GSH-Pool der Zelle steht, sowie eine Verminderung des NADPH/NADP-Quotienten isolierter Langerhansscher Inseln nach Inkubation mit Streptozocin gezeigt werden.
Allerdings konnte durch vorherige Gabe von GSH keine Abschwächung der diabetogenen Wirkung von Streptozocin erzielt werden (Hoftietzer, 1975).
Eine andere Arbeitsgruppe um Slonim konnte durch Gabe von niedrigen Dosen des als Antioxidans wirkenden Vitamin E eine Minderung des Streptozocineffektes nachweisen (Slonim et al., 1977).
Von Dean und Matthews wurde 1972 berichtet, daß Streptozocin die Ausbildung von Aktionspotentialen durch Glucose, Mannose, Leucin und Glycerinaldehyd unterdrücken kann, nicht aber nach Zusatz von Tolbutamid.

Aus all diesen Beobachtungen ergibt sich, daß Streptozocin entweder über Radikalbildung oder, indem es selbst als Oxidans wirkt, den Redoxstatus der ß-Zelle beeinflußt und in Folge die

Insulinsekretion mindert.

Dieser pharmakologische Hilfsstoff Streptozocin kann somit u.a. dazu verwendet werden, der Lokalisation des Einflusses des Redoxsystems der ß-Zelle im Mechanismus der Insulinsekretion näherzukommen, indem einzelne Teilschritte des 'Stimulus-secretion coupling' untersucht werden.

1.1.4 Exogenes Insulin und Insulinsekretion

Von verschiedenen Autoren konnte gezeigt werden, daß exogenes Insulin in vitro die glucoseinduzierte Insulinsekretion zu hemmen vermag (Frerichs et al., 1965; Iversen et Miles, 1971; Rappaport et al., 1972; Loreti et al., 1974; Ammon und Verspohl, 1976). Dabei ist der Hemmeffekt des Insulins von der Glucosekonzentration im Medium abhängig. Verspohl et al., 1982 fanden, daß exogenes Insulin im Bereich von 200 µE/ml - 800 µE/ml keinen Einfluß auf die durch substimulatorische Glucosekonzentration von 5,6 mM hervorgerufene Insulinsekretion hat, wohl aber in der Lage ist, die durch Glucose 11,2 mM bzw. Glucose 16,7 mM induzierte Insulinsekretion dosisabhängig zu hemmen, wobei der halbmaximale Hemmeffekt (= ED 50) mit 160 µE Insulin/ml angegeben wird.

Ebenso konnte eine Hemmung der durch Glucose plus para-Chlormercuribenzoat und Glucose plus Tolbutamid (Ammon et al., 1980), wie auch der durch Leucin oder Arginin in Anwesenheit von Glucose (Verspohl et al., 1982) hervorgerufenen Insulinse-

kretion bei Zusatz von exogenem Insulin festgestellt werden. Auch in-vivo-Versuche bestätigen den Rückkopplungseffekt von Insulin. So konnte nach Injektion mit Antiinsulinserum eine erhöhte Insulinsekretion beobachtet werden (Wagle, 1965; Logothetopoulos et al., 1965). Des weiteren wird dieser Befund bestätigt durch die Tatsache, daß hyperinsulinämische Tiere, deren Hyperinsulinämie auf einen insulinproduzierenden Tumor zurückgeführt werden kann, auf Glucosereiz nur mit einer verminderten Insulinsekretion reagieren (Sodoyez et al., 1969).

Diese negative feed-back-Wirkung des Insulins auf seine Sekretion wird durch Interaktion von Insulin mit einem Insulinrezeptor der Langerhansschen Insel vermittelt (Verspohl und Ammon, 1980), wobei gezeigt werden konnte, daß der Insulinrezeptor der Langerhansschen Insel unterschiedliche Eigenschaften im Vergleich mit Insulinrezeptoren anderer Gewebe, wie Leber, Muskel- oder Fettzelle, aufweist (Verspohl et al., 1982a).

Exogen zugesetztes Insulin hemmt den Metabolismus von Glucose in der Langerhansschen Insel über den Pentosephosphatweg (Ammon und Verspohl, 1976), vermutlich durch Hemmung des Enzyms Glucose-6-phosphatdehydrogenase und führt so dosisabhängig zu einer Abnahme des NADPH/NADP-Quotienten (Akthar et al., 1977; Ammon et al., 1980).
Auch konnte von Ammon und Mitarbeitern, 1980 gezeigt werden, daß unter Einfluß von exogenem Insulin der GSH-Pool der Langerhansschen Insel sowohl in Anwesenheit von 5,6 mM Glucose als auch - weitaus stärker - in Anwesenheit von 16,7 mM Glucose vermindert wird.

Keinen Einfluß besitzt exogen zugesetztes Insulin auf den cAMP-Gehalt der Langerhansschen Insel (Heinzl, 1979), und ebensowenig wird eine Änderung der Aktivität der low-Km Phosphodiesterase Langerhansscher Inseln beobachtet (Kallenberger, 1980), ein Effekt, der von anderen Geweben wie Fett- oder Leberzellen her bekannt ist (Kono et al., 1975).

Von Auswirkungen exogenen Insulins auf Ionenfluxe an der Langerhansschen Insel wurde vor kurzem von unserem Arbeitskreis berichtet. So konnte gezeigt werden, daß exogenes Insulin in der Lage ist, die durch Glucose 20 mM stimulierte 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln dosisabhängig zu hemmen, wohingegen die basale 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln in Anwesenheit von Glucose 3 mM nicht beeinflußt wird.
Auch soll das Membranpotential, das in enger Beziehung zu den Ionenfluxen steht, durch Zusatz von exogenem Insulin verändert werden. Dies wird in einer Arbeit von Pace et al., 1977 gezeigt, wobei allerdings sehr hohe, unphysiologische Dosen von Insulin eingesetzt wurden (2,5 - 250 mE/ml).
Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu Befunden von Meissner, der keine Änderung des Membranpotentials durch Zusatz von exogenem Insulin in Dosen von 0 - 800 µE Insulin/ml in seinem Modell der Membranpotentialmessung findet (persönliche Mitteilung).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß exogenes Insulin seine eigene Sekretion durch negative feed-back-Hemmung beeinflußt. Vermittelt über eine Insulinrezeptorinteraktion an der

Langerhansschen Insel wird der Glucosemetabolismus über den Pentosephosphatshunt verringert, woraus eine Verminderung des NADPH- und GSH-Gehaltes der ß-Zelle resultiert.
Eine Beziehung zwischen exogenem Insulin und Redoxsystem der ß-Zelle einerseits und Ionenfluxen andererseits konnte bereits hergestellt werden; so ist die glucoseinduzierte 45-Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel durch exogen zugesetztes Insulin hemmbar.
Widersprüchlich hingegen sind Aussagen über die Beeinflussung des Membranpotentials der ß-Zelle durch Insulin.
Daher ist zur näheren Lokalisation der Bedeutung der Thiole für den Mechanismus der Insulinsekretion die Untersuchung, inwieweit exogenes Insulin die Kaliumpermeabilität beeinflußt, von besonderer Bedeutung, insbesondere auch deshalb, weil exogenes Insulin einen physiologischen Inhibitor der glucoseinduzierten Insulinsekretion darstellt.

1.2 Fragestellung

1. In der vorliegenden Arbeit sollte in erster Linie eine Methode zur Bestimmung der Kaliumfluxe in isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte eingeführt werden, mit Hilfe derer verschiedene nachfolgende Fragestellungen bearbeitet und beantwortet werden können.
Aus der Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Methoden (3.1) zur Bestimmung der Kaliumpermeabilität wurde eine häufig

verwendete, bei der das Kaliumion durch radioaktiv markiertes Rubidium in Form von 86-Rb ersetzt wird, als Grundlage benutzt, um damit unter den gegebenen apparativen und technischen Voraussetzungen eine eigene Methode zu erstellen, die für die zu untersuchenden Fragestellungen ein ausreichend exaktes und aussagekräftiges Ergebnis liefert.

Die Erarbeitung der Methodik konnte in mehrere Teile untergliedert werden:

1. Beladung der Langerhansschen Inseln bis zum steady-state-Gleichgewicht mit radioaktiv markiertem Rubidium, sowie die Bestimmung des Gehaltes an aufgenommenem Rubidium in die Langerhanssche Insel.

2. Untersuchung des Rubidiumeffluxes aus vorbeladenen Langerhansschen Inseln unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

3. Da sich im Lauf der Versuche zur Methodik herausstellte, daß eine statische Meßmethode nicht sensibel genug war, um die zu untersuchenden Fragestellungen hinreichend beantworten zu können, wurde eine Perifusionsmethode eingeführt. Die erstellte Methodik wurde auf ihre Funktionsfähigkeit überprüft, indem verschiedene Substanzen, deren Effekt auf den 86-Rubidiumefflux bereits in der Literatur beschrieben war, hier gemessen wurden.

Mit dem Modell der 86-Rubidiumeffluxmessung aus Langerhansschen Inseln sollte eine Beziehung zwischen dem Redoxsystem der redu-

zierten Pyridinnukleotide bzw. dem GSH/GSSG-System der Zelle einerseits und Ionenfluxen andererseits hergestellt werden.

Hierzu sollten zwei Substanzen untersucht werden, von denen bekannt ist, daß sie auf das Redoxsystem der ß-Zelle einwirken.

Die diabetogene Substanz Streptozocin führt sehr rasch zu einer sehr starken Verminderung der Pyridinnukleotide in der Langerhansschen Insel und vermindert den GSH-Pool der ß-Zelle.
Es sollte untersucht werden, ob durch diese Substanz auch eine Veränderung der Kaliumpermeabilität festgestellt werden kann.
Ebenso war die Frage interessant, ob die Wirkung von Streptozocin auf die Insulinsekretion reversibel ist, oder ob schon nach relativ kurzer Einwirkungszeit mit einer irreversiblen Schädigung der ß-Zelle gerechnet werden muß.

Exogenes Insulin, ein physiologischer Inhibitor der Insulinsekretion, führt ebenfalls zu einer Verminderung des NADPH/NADP- und des GSH/GSSG-Quotienten in der ß-Zelle.
Es sollte geprüft werden, ob durch Zusatz von exogenem Insulin auch die Kaliumpermeabilität beeinflußt wird, insbesondere weil unterschiedliche Aussagen aus elektrophysiologischen Messungen dazu vorliegen.
Da in unserem Arbeitskreis bereits gezeigt werden konnte, daß exogenes Insulin die glucoseinduzierte 45-Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel hemmt, sollte mit der Untersuchung der Kaliumfluxe der Angriffspunkt von exogenem Insulin im Rahmen der feed-back-Hemmung auf die Kaskade des Insulinsekretionsmechanismusses näher lokalisiert werden.

2. M A T E R I A L

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts verwendet. Das Körpergewicht der Tiere betrug zwischen 200 und 300 g. Die Haltung erfolgte in Makrolon-Käfigen bei einer Raumtemperatur zwischen 24 und 26°C und bei einer relativen Luftfeuchte von 55 - 65 % im 12-Stunden Tag/Nacht-Rhythmus. Die Ratten erhielten Standardtrockenfutter der Firma Altromin, Lage/Lippe und Trinkwasser ad libitum.

2.2 Geräte

Stereomikroskop Nikon SM 6

Schüttelwasserbad, Firma Köttermann

Beckman Digital pH-Meter, Modell 3560

Ultraschallbad Econoclean

Gamma Zähler, Nuclear Chicago

Whirlmix, Vortex-Genie, Firma Wilten u.Co., Holland

Tricarb liquid scintillation spectrometer, Mod. 3385, Firma Packard

Szintillations-Zählfläschchen, Firma Zinsser, Frankfurt a.M.

Apple II europlus

Polystyrolröhrchen, Firma Greiner, Nürtingen

Nylonnetze, Fadendicke ca. 50 µm, Maschenweite 54 µm, Firma Maierthaler, Köln

Plexiglashaube zur Begasung der Proben, Eigenbau

Perifusionsapparatur bestehend aus

- Kammerteil aus Plexiglas, Eigenbau (s. 2.7)
- Wasserbad aus Kunsstoff
- Schlauchpumpe, Gilson Minipuls 2, Firma Abimed, Düsseldorf
- Pumpenschläuche, Firma Abimed, Düsseldorf
- Teflonzu- und ableitschläuche, Firma Latek, Heidelberg
- Membranfilter, Cellulosenitrat, Format 25, Porengröße 8.0, Firma Sartorius
- Thermostat, Thermo-Temp, Firma mgw, Lauda
- 4-Wege-Hahn, Firma Latek, Heidelberg
- Fraktionssammler, Ultrorac II, Firma LKB, Karlsruhe

Zentrifuge 5413, Firma Eppendorf

Dialysierschlauch, Visking 36/32, Firma Serva Feinbiochemica, Heidelberg

Magnetrührer, IKA-Combimag RCT, Firma Janke und Kunkel KG, Staufen im Breisgau

Olivetti Tischcomputer P 602

2.3 Chemikalien

2.3.1 Bezogene Chemikalien und Enzyme

Carbogen (95 % O2/5 % CO2)	Firma Mast, Tübingen
Collagenase (126 - 196 U/mg)	Worthington Biochem. Corp. Freehold N.J. USA
α-D-Glucose	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Rinderserumalbumin	Behringwerke, Marburg
Hyaminhydroxid	New England Nuclear, Boston, USA
Gewebelöser	Firma Riedel-de Haen, Seelze 1/ Hannover
Unisolve I	Firma Zinsser, Frankfurt a.M.
86-Rb	Amersham Buchler, Braunschweig
Rubidiumchlorid purum p.a.	Fluka AG, Chem. Fabrik, Buchs, Schweiz
Dextran MG 60000 - 90000	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
D-6-14C-Glucose 60,5 mCi/mmol	Amersham Buchler, Braunschweig
HEPES	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Insulin Radioimmunoassay Kit-INSIK	Isotopendienst West, Sprendlingen
Ratteninsulin	Novo Research Institute, Bagsvaerd, Dänemark
Streptozocin	Sigma Chemie GmbH, München

Alle anderen, nicht angeführten Substanzen wurden von der Firma Merck, Darmstadt, in der jeweils reinsten Form (p.a.) bezogen.

2.3.2 Dialyse von Rinderserumalbumin

Nachdem sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß das von der Firma Behringwerke, Marburg, bezogene Rinderserumalbumin für die Perifusionsmethode nicht geeignet war, da sich die Poren des Membranfilters bei fortlaufender Perifusion zusetzten, wodurch ein zu hoher Druck innerhalb der Perifusionskammer entstand (erkennbar an den Abdrücken der Deckelstruktur am Membranfilter), und dieses Phänomen eindeutig auf Verunreinigungen des Rinderserumalbumins zurückzuführen war (Henquin, persönliche Mitteilung), wurde dasjenige RSA, das den Perifusionsmedien zugesetzt wurde, vor der Verwendung dialysiert.

Hierzu wurden 0,5 l einer 20 %igen (G/V) wässrigen Rinderserumalbuminlösung hergestellt, 1,86 g EDTA-Na (= 10 mM) zugefügt und dieser Ansatz über Nacht im Kühlschrank bei einer Temperatur von +4°C belassen.

Danach wurde diese Lösung in zuvor ausgekochte Dialysierschläuche gefüllt und bei Temperaturen von +4°C (Kühlraum) 7 Tage lang jeweils gegen 10 l Aqua dest. dialysiert.

Das Medium wurde zunächst alle 6 Stunden, nach 3 Tagen nurmehr alle 8 Stunden gewechselt.

Nach Beendigung der Dialyse wurde die so gereinigte Rinderserumalbuminlösung durch Zusatz von Aqua dest. auf einen Gehalt von 10 % (G/V) eingestellt und portionsweise bei -20°C bis zum Gebrauch eingefroren.

2.4 Elektrolytlösungen

2.4.1 Hanks Lösung (Hanks und Wallace, 1949)

Stammlösung:

NaCl	80,00 g
KCl	4,00 g
Na2HPO4 x 2 H2O	0,60 g
KH2PO4	0,60 g
MgSO4 x 7 H2O	2,00 g
CaCl2 x 2 H2O	1,85 g
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

Vor Gebrauch wurde diese Stammlösung mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1 : 10 verdünnt, Glucose 0,5 mg/ml (= 2,8 mM) zugesetzt und mit NaHCO3-Lösung auf pH 7,35 eingestellt.

2.4.2 Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung (KRB-Lösung)

Die verwendete KRB-Lösung setzt sich nach der Originalbeschreibung von Umbreit und Mitarbeitern, 1972 folgendermaßen zusammen:

NaCl-Lösung	0,90 % = 154 mM	100 Teile
KCl-Lösung	1,15 % = 154 mM	4 Teile
CaCl2-Lösung	1,22 % = 110 mM	3 Teile
KH2PO4-Lösung	2,11 % = 154 mM	1 Teil
MgSO4-Lösung	3,82 % = 154 mM	1 Teil
NaHCO3-Lösung	1,30 % = 154 mM	21 Teile

Um jederzeit eine frische Lösung zur Verfügung zu haben, erwies es sich als praktisch, drei voneinander getrennte Lösungen folgender Zusammensetzung herzustellen:

Lösung A:

NaCl	69,20 g
KCl	3,61 g
KH_2PO_4	1,62 g
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	2,93 g
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

Lösung B:

$NaHCO_3$	21,10 g
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

Lösung C:

$CaCl_2 \times 2 H_2O$	3,73 g
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

Vor der Verwendung wurde folgende Mischung hergestellt:

Lösung A	1 Teil
Lösung B	1 Teil
Lösung C	1 Teil
Aqua bidest.	7 Teile

Diese KRB-Lösung wurde 30 Minuten lang mit Carbogen begast.

2.5 Inkubationsmedien

Im Einzelnen wurden folgende Lösungen verwendet:

2.5.1 Vorinkubationsmedium

KRB-Lösung	Rinderserumalbumin 2 %
	Glucose 3 mM

2.5.2 Inkubationsmedium zur Rubidiumaufnahme (= Hauptinkubationsmedium)

Grundlage bildet hier KRB-Lösung mit Glucose 3 mM, der das radioaktiv markierte Rubidium zugesetzt wurde. Es wurden im Laufe der Versuche zur Einführung einer eigenen, modifizierten Methode zur Rubidiumfluxmessung verschiedene Parameter geändert und zwar

a) die Rubidiumkonzentration der Lösung durch Zusatz von nicht markiertem Rubidium als Rubidiumchlorid
b) Zusatz von Rinderserumalbumin 5 %.
c) Zusatz von Dextran 6 %
d) Erhöhung der Glucosekonzentration auf 16,7 mM
e) Ersatz des Kaliums in der KRB-Lösung durch äquimolare Mengen inaktiven Rubidiums als Rubidiumchlorid
f) Zusatz von HEPES (20 mM) als Ersatz des $NaHCO_3$ in der KRB-Lösung

2.5.3 Waschmedium

KRB-Lösung	Rinderserumalbumin 5 % Glucose 3 mM
später: KRB-Lösung	ohne Rinderserumalbumin Glucose 3 mM
später: KRB-Lösung	ohne Rinderserumalbumin Glucose 16,7 mM
später: KRB-Lösung	ohne Rinderserumalbumin Glucose 16,7 mM Ersatz des $NaHCO_3$ in der KRB-Lösung durch HEPES 20 mM

2.5.4 Effluxmedium

Krebs-Ringer-Lösung, wobei statt $NaHCO_3$ HEPES 20 mM zur Pufferung zugesetzt wurde;
Glucose 3 mM bzw. 16,7 mM, RSA 5 %

Alle Medien wurden auf pH 7,35 eingestellt.

2.5.5 Medium für die Perifusionsversuche (ab 3.4.5)

Für die Perifusionsversuche wurde eine modifizierte Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung verwendet; im Unterschied zu der unter 2.4.2 beschriebenen Lösung wurde hier auf die Anionen Sulfat sowie Phosphat verzichtet, sowie der Bicarbonatgehalt der Lösung von 25 mM auf 20 mM verringert. Durch den geringeren Gehalt an Bicarbonationen wurde eine optimale Pufferung der Lösung im Zusammenspiel mit dem Carbogengemisch 95:5 O2:CO2 erreicht. Die Entfernung der beiden obengenannten Anionen hat keinen nachteiligen Einfluß auf die Physiologie der Langerhansschen Insel (Henquin, persönliche Mitteilung).

Diese neue Lösung setzt sich folgendermaßen zusammen:

NaCl	122,0 mM
KCl	4,7 mM
CaCl2	2,5 mM
MgCl2	1,1 mM
NaHCO3	20,0 mM

Es erwies sich auch hier als praktisch, 3 voneinander getrennte Lösungen herzustellen:

Lösung A:

NaCl	71,3 g
KCl	3,5 g
MgCl2 x 6 H2O	2,236 g
Aqua bidest. ad	1000,0 ml

Lösung B:

$NaHCO_3$	16,8 g
Aqua bidest. ad	1000,0 ml

Lösung C:

$CaCl_2 \times 2 H_2O$	3,675 g
Aqua bidest. ad	1000,0 ml

Vor Verwendung wurde folgende Mischung hergestellt:

Lösung A	1 Teil
Lösung B	1 Teil
Lösung C	1 Teil
Aqua bidest.	7 Teile

Diese KRB-Lösung wurde vor Verwendung als Perifusionsmedium mindestens 30 Minuten lang mit Carbogen begast. Sodann wurden die erforderlichen Mengen Glucose, Rinderserumalbumin sowie die zu untersuchenden Substanzen zugegeben und der pH-Wert der Lösung auf 7,35 eingestellt.

2.5.6 Herstellung der Medien mit Streptozocin

Da bekannt ist, daß Streptozocin in wässriger Lösung sehr instabil ist (Herr et al., 1959), insbesondere dann, wenn, wie in den Perifusionsmedien, ein pH-Wert von 7,35 eingestellt ist und die Medien auf 37°C thermostatiert sind - hier beträgt die

Halbwertszeit 12 Minuten (Ritter, 1973) -, wurde erst direkt vor dem Umschalten auf das streptozocinhaltige Medium (vgl. 3.5.2) die sehr gut wasserlösliche Substanz, die bei Temperaturen von -20°C im Exsikkator aufbewahrt wurde, im entsprechenden Medium gelöst.

2.5.7 Herstellung und Überprüfung der Medien mit exogenem Insulin

Im Verlauf der Untersuchungen des Einflusses von exogenem Insulin auf den 86-Rubidiumefflux aus Langerhansschen Inseln wurden 2 Chargen Ratteninsulin der Firma Novo verwendet.

Charge 1: 2130 mE/100 µg; Charge 2: 2450 mE/100 µg

Diese beiden als Lyophilisate vorliegenden Ausgangssubstanzen verdünnte man mit dem von der Firma angegebenen Puffer folgender Zusammensetzung auf einen Insulingehalt von 80 mE/ml:

$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	5,77 g
$NaH_2PO_4 \times 2\ H_2O$	1,05 g
Rinderserumalbumin	60,0 g
Thiomersal	0,24 g
NaCl	6,0 g
Aqua bidest. ad	1000,0 ml

Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,35 eingestellt und diese Lösung nun portionsweise bei -20°C eingefroren (1 ml = 80 mE; 0,5 ml = 40 mE; 0,25 ml = 20 mE).

Um sicherzugehen, daß die im Perifusionsexperiment tatsächlich eingesetzten Mengen an exogenem Insulin den theoretisch errechneten Werten entsprechen, wurde der Gehalt verschiedener solcher Portionsproben durch Bestimmung im Radioimmunoassay (3.2.8) überprüft.
Hierbei ergab sich, daß die eingesetzten Mengen an Ratteninsulin dem tatsächlich angegebenen Gehalt entsprachen.
Kurz vor Versuchsbeginn bzw. dem Umschalten auf das insulinhaltige Medium wurde je nach verwendeter Konzentration eine Probe aufgetaut und dem Medium zupipettiert.

2.6 Gefäße

Nachdem in unserem Arbeitskreis die sogenannten Netzgefäße entwickelt wurden und sich bei Arbeiten zur Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln bewährt hatten, wurden dieselben Gefäße zu diesen Messungen der Rubidiumfluxe verwendet (Ammon et al., 1983).
Gegenüber bisher beschriebenen Methoden zur Bestimmung des Rubidiumeffluxes (Tabelle I) besitzen diese Netzgefäße den Vorteil, daß

1. ein Umsetzen der Inseln in ein anderes Medium schnell und ohne mechanische Belastung für das Inselmaterial durchgeführt werden kann.
2. ein relativ kurzes Waschen, wie es für diese Versuche notwendig ist, gut erreicht werden kann.

3. Kontaminationsgefahren durch die einfache Handhabung der gesamten Röhrchen auf ein Minimum reduziert sind.

Es handelt sich um Polystyrolröhrchen mit einem Durchmesser von 6,5 mm und 40 mm Höhe, bei denen der Rundboden abgesägt und durch ein Nylonnetzblättchen von 6,5 mm Durchmesser, Maschenweite 54 µm, ersetzt wurde. Auf dieses Nylonnetz wurden die Inseln einpipettiert; anschließend wurden die Reaktionsröhrchen in 0,7 ml des entsprechenden Mediums eingebracht, das zuvor in Polystyrolröhrchen von 15 mm Durchmesser und 30 mm Höhe einpipettiert worden war.
Beim Wechsel von einem in ein anderes Medium wurde das Reaktionsröhrchen zur Entfernung von Mediumsresten kurz auf eine saugfähige Unterlage gestellt.

Da die Messung des Rubidiumgehaltes in sehr hohem Maße durch anhaftende Partikel sowie Verunreinigungen gestört wird, wurden sowohl die Nylonnetze als auch die Polystyrolröhrchen vor dem Verkleben in Äthanol 90 % im Ultraschallbad 15 Minuten lang gereinigt. Es wurde auch nach dem Verkleben darauf geachtet, daß eine Wiederverschmutzung, speziell der Netze, durch Schmutzpartikel oder Polystyrolteilchen vermieden wurde.

2.7 Perifusionsapparatur

2.7.1 Aufbau

Die verwendete Perifusionsapparatur wurde aufgebaut in enger Anlehnung an eine Apparatur, die von Dr. Henquin, Brüssel, zu Versuchen zur Bestimmung des Calciumeffluxes, des Rubidiumeffluxes und zur Bestimmung der Insulinsekretion verwendet wird.
Die hier nachgebaute Apparatur besteht aus den Vorratsgefäßen für die verschiedenen Perifusionsmedien - pro Kammer sind 2 Gefäße notwendig -, einem Umschaltventil (= 4-Wege-Hahn), einer Schlauchpumpe, den Perifusionskammern, in denen sich die isolierten Inseln befinden, und einem Fraktionssammler zum Auffangen des Mediums (Abbildung 4).
Die Vorratsgefäße befinden sich in einem auf 37°C thermostatierten Wasserbad.
In diesen Gefäßen werden die Perifusionsmedien laufend mit Carbogen durch einen in die Flüssigkeit eintauchenden Teflonschlauch begast.
Gleichmäßige Begasung ist Voraussetzung für eine Konstanthaltung des pH-Wertes des KRB-Perifusionsmediums während der gesamten Versuchsdauer.
Die Verschaltung der Schläuche am 4-Wege-Hahn war wie folgt:
Jeweils ein 4-Wege-Hahn ist einer Perifusionskammer zugeordnet. Pro Kammer werden, wie unter 3.2.9.6 beschrieben, 2 verschiedene Perifusionsmedien benötigt, d.h. 2 Zuleitungen aus den beiden Medien am Umschaltventil.
Eine Ableitung muß zu der jeweiligen Perifusionskammer führen.

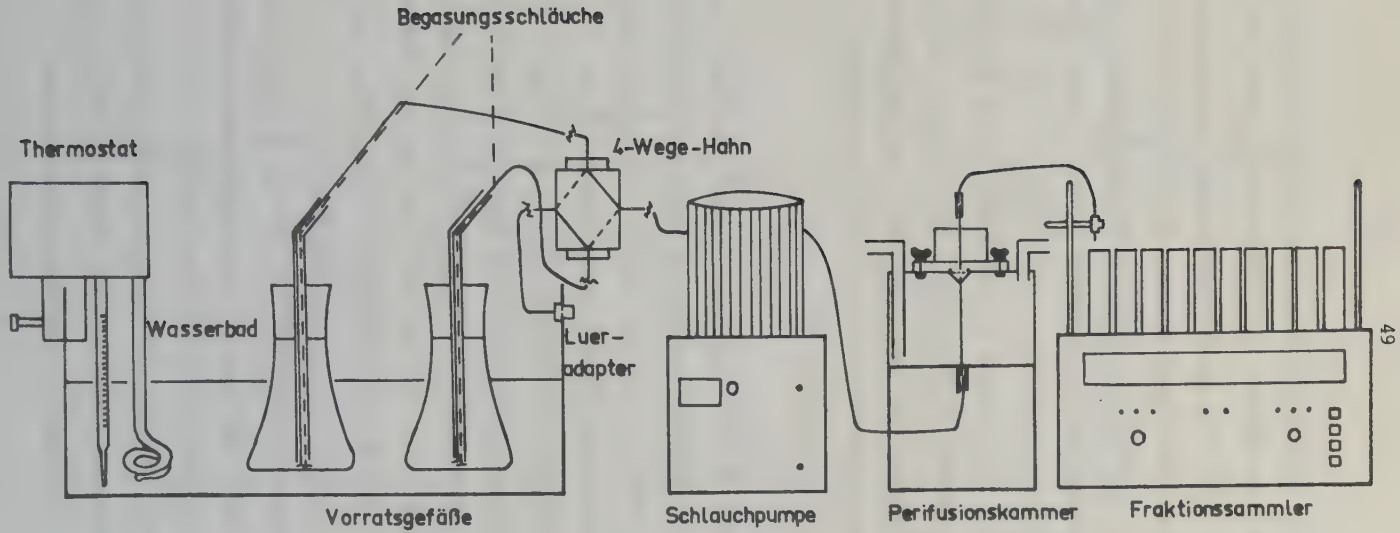


Abb. 4: Perifusionsapparatur zur 86-Rubidiumeffluxmessung aus isolierten Langerhansschen Inseln
(Schematische Darstellung)

Der letzte Ausgang am 4-Wege-Hahn wird durch ein kurzes Schlauchstück besetzt, das in einen Luer-Spritzenadapter endet. Die 4 Zu- bzw. Ableitungsschläuche werden so am 4-Wege-Hahn angebracht, daß in jeder Stellung des Ventils je ein Perifusionsmedium mit der Ableitung zur Perifusionskammer verschaltet ist. Das andere Perifusionsmedium ist nun mit dem "Lueradapterschlauchstück" verschaltet.
Dies dient dazu, um kurz vor dem Umschalten auf das im Moment nicht zur Kammer fließende Medium mit Hilfe einer Luerspritze dieses Medium an das Ventil anzusaugen, um einen Totraum, d.h. Luftblasen und damit evtl. auftretende Unregelmäßigkeiten, beim Umschalten zu vermeiden.

Die eigentliche Perifusionskammer besteht aus einem - vollständig aus Plexiglas gefertigten - rechteckigen Kästchen von 17,5 cm Breite, 8,5 cm Tiefe und 4,8 cm Höhe. Die Stärke des Plexiglases beträgt an allen Stellen 5 mm, nur der Deckel ist aus 8 mm starkem Material gefertigt. Im Deckel sind 2 Öffnungen für ständigen Wasserzu- und abfluß angebracht. Dies dient dazu, daß das gesamte Kästchen ständig von 37°C warmem Wasser durchströmt werden kann, d.h. daß auch in der Perifusionskammer selbst, in der sich die isolierten Inseln befinden, eine konstante Temperatur von 37°C gewährleistet ist.
Im Deckel des Kästchens befindet sich eine konische Bohrung (in unserem Aufbau sind jeweils 2 Perifusionskammern aus Platzgründen auf einem Plexiglaskästchen untergebracht) mit 1,2 cm Durchmesser, sodaß der Rauminhalt der Bohrung genau 0,3 ml beträgt. In dieser Bohrung, die die eigentliche Perifusionskammer darstellt, befinden sich die isolierten Inseln (Abb. 5).

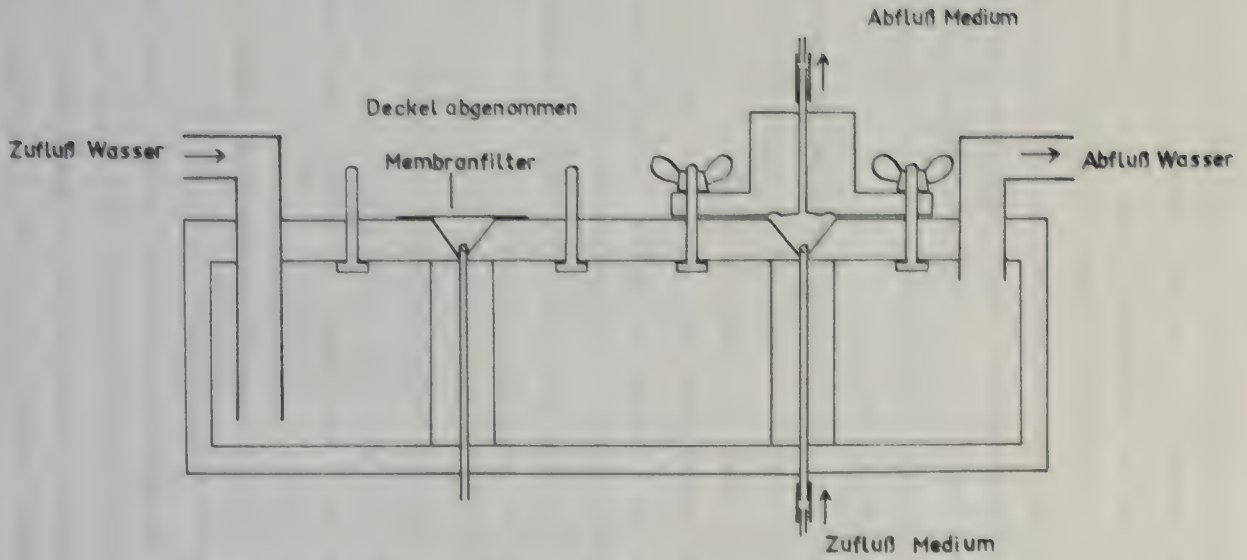


Abb. 5: Perifusionskammer (Querschnitt)
Erläuterungen siehe Text

Das Perifusionsmedium strömt von unten kommend - durch das Kästchen hindurch - in einem Metallröhrchen von 1,5 mm Durchmesser, das oben verschlossen ist, seitlich mit 3 Löchern versehen ist und gerade in die Bohrung hineinragt, in die Kammer ein. Es sind diese seitlichen Bohrungen notwendig, um eine zu hohe Druckbelastung in der Kammer zu vermeiden und um das Medium gleichmäßig verteilt in die Kammer einfließen zu lassen. Die Inseln werden von diesem Medium umspült, das dann die Kammer nach oben hin verläßt.

Ein Aufwirbeln und Mitreißen der Inseln durch den Flüssigkeitsstrom wird dadurch verhindert, daß ein Membranfilter den Abschluß der Kammer nach oben hin bildet.

Auf die konische Bohrung ist, genau passend, ein Deckel aufgesetzt, der - besonders gefräst (Abb. 6) - die abfließende Flüssigkeit aufnimmt, sammelt und über ein zentral eingebrachtes Metallröhrchen (Durchmesser 1,5 mm) und den Ableitungsschlauch dem Fraktionssammler zuführt.

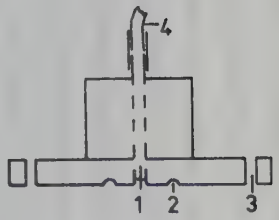
Der Deckel, der ebenfalls aus Plexiglas gearbeitet ist, wird durch 4 Schrauben fest mit dem Kammerteil verbunden.

Dichtheit des Systems wird dadurch gewährleistet, daß am Rand des Deckels vor Versuchsbeginn ein dünner Strang Silikonfett aufgebracht wird.

Als Zu- und Ableitungsschläuche werden Teflonschläuche mit einem Innendurchmesser von 0,8 mm verwendet.

Die Flußgeschwindigkeit des Mediums beträgt 1,1 ml pro Minute und wurde im Verlauf der Versuche ständig kontrolliert.

Die Totzeit des gesamten Systems (von Umschaltventil bis Fraktionssammler) beträgt 1,4 min (= 1,54 ml), die Totzeit von Umschaltventil bis Kammer 0,6 min (= 0,64 ml).



1 zentrales Metallröhrchen
2 Fräsrille
3 Bohrung für Schrauben
4 Ableitungsschlauch

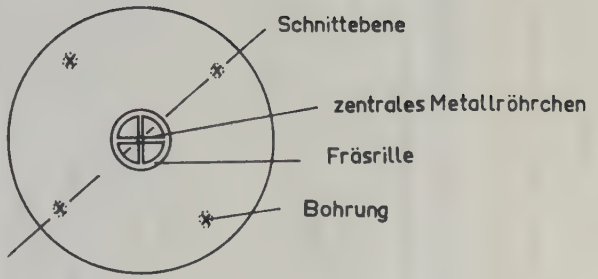


Abb. 6: Deckel der Perifusionskammer (Maßstab 1:1)
Linke Seite: Querschnitt
Rechte Seite: Aufsicht, mit Angabe der Schnittebene für Querschnittszeichnung

2.7.2 Vorbereitung der Perifusionsapparatur für die Versuche

Vor jedem Versuch wurde, nachdem die Vorratsgefäße in das thermostatierte Wasserbad eingebracht waren sowie gleichmäßige Carbogenbegasung der Medien sichergestellt war, die Schlauchpumpe angeschaltet, um die Zuleitungsschläuche und auch die Kammern mit Medium anzufüllen. Durch mehrmaliges Umschalten des 4-Wege-Hahns und Ansaugen der Medien über den Lueradapter wurde sichergestellt, daß das gesamte Zuleitungssystem luftblasenfrei gefüllt war.
Die Kammer wurde sodann etwa zur Hälfte mit dem jeweiligen Perifusionsmedium angefüllt und war somit bereit, die mit 86-Rb beladenen und gewaschenen Inseln (3.2.9.5) aufzunehmen.

2.7.3 Reinigung der Perifusionsapparatur

Nach Beendigung des Versuches und nach Entfernen der Inseln aus der Kammer wurde ein neues Membranfilter eingelegt und die Kammern jeweils ca. 30 Minuten lang mit H_2O dest. 37°C durchspült. In diesem Waschmedium konnte - am Ende der Waschperiode - kein radioaktives 86-Rb mehr nachgewiesen werden, d.h. die Kammer sowie die ableitenden Schläuche waren frei von 86-Rubidium.
Es mußte also bei nachfolgenden Versuchen nicht mit Fehlern durch Verunreinigung der Kammer und des Ableitungssystems mit 86-Rb gerechnet werden.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Methodenwahl

Es werden in der Literatur mehrere Methoden zur Untersuchung der Kaliumfluxe in Langerhansschen Inseln angegeben:
Eine sehr elegante Methode, die nicht nur über Kaliumfluxe, sondern über alle z.B. bei einer Glucosestimulation auftretenden Ionenfluxe an der ß-Zellmembran Langerhansscher Inseln Aufschluß gibt, wird von Meissner, 1976 beschrieben. Er verwendet Mikroelektroden zur Messung von Potential und Potentialänderungen an ß-Zellen Langerhansscher Inseln. Diese Methode erfordert einen hohen apparativen Aufwand, des weiteren werden von diesem Autor wegen der leichteren Handhabung für diese Methodik nur Langerhanssche Inseln von Mäusen verwendet.
Boschero, 1977 beschreibt eine Methode zur direkten Bestimmung von Kalium in der Insel mit Hilfe der Atomabsorption. Neben hohem apparativen Aufwand werden hier 2000 Langerhanssche Inseln pro Bestimmung benötigt.
Eine weitere Möglichkeit, Kaliumfluxe zu untersuchen, wird unter anderem von Henquin, 1978 beschrieben. Hier wurde der Langerhansschen Insel das radioaktive Isotop 42-Kalium angeboten, das die Insel anstatt des stabilen Isotops 39-Kalium in die Zellen aufnimmt. Obwohl diese Methode sehr gute Ergebnisse auf Grund der sehr einfachen und genauen Meßbarkeit ergibt, besteht

ein großer Nachteil darin, daß das Isotop 42-Kalium sehr instabil ist und mit einer Halbwertszeit von nur 12,36 Stunden zerfällt.

Nachdem von vielen Geweben bekannt ist, daß Rubidiumionen anstelle von Kaliumionen treten können (Gwirtsman et al., 1980; Zehran, 1980), wurde auch für das Inselgewebe bestätigt, daß Rubidiumionen Kaliumionen ersetzen können, allerdings mit der Einschränkung, daß diese Aussage nur in qualitativer Hinsicht richtig ist, zur quantitativen Bestimmung z.B. des absoluten Kaliumgehaltes der Insel aber ungeeignet ist (Malaisse, 1978).

So wird von vielen Autoren (Tabelle I) diese Methode, Rubidium als Tracer für Kalium zu verwenden, angewandt, da 86-Rubidium gegenüber 42-Kalium den Vorteil der längeren Halbwertszeit besitzt (18,7 Tage gegenüber 12,36 Stunden).

Die von diesen Autoren beschriebenen Versuchsbedingungen wurden als Grundlage für die Erstellung einer eigenen Methode zur Bestimmung der Kaliumfluxe in der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte verwendet.
Auf Grund der vorhandenen technischen Möglichkeiten wurde eine Inkubationsmethode gewählt, wie sie unter anderem von Sehlin und Täljedal, 1974 beschrieben wurde, in Anlehnung auch an die in diesem Arbeitskreis durchgeführten Arbeiten zur Bestimmung der 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln (Ammon et al., 1983; Hägele, 1981).
Im Verlauf der Versuche wurde diese Methode verlassen und auf

Autor / Jahr	verwendete Tierspezies	eingesetzte Inselzahl	Inkubations-medium	Inkubations-dauer	Menge und Aktivität von ^{86}Rb	Wasch-vorgang
Boschero 1979	Ratte	100	KRB-Lösung RSA 5%. Glucose 2,8 mM	60 min	0,12 - 0,69 mM ≙ ca.80 µCi/ml	2-maliges Waschen
Carpinelli 1980	weibliche Albino Ratte	100	? Glucose 16,7 mM	60 min	0,3 - 0,6 mM ≙ 100 µCi/ml	3-maliges Waschen
Hellman 1975	ob/ob Maus	?	Bicarbonat-puffer Glucose 3 mM	120 min	70 µM ≙ 290 Ci/mol	2 sec lang
Henquin 1980	männliche Wistar Ratte	50 - 60	KRB-Lösung RSA 5%. Glucose 3 mM	120 min	0,25 mM ≙ 420-540 mCi/ mmol	3 mal mit 5 ml Puffer 20°C
Malaisse 1978	weibliche Albino Ratte	100	KRB-Lösung Glucose 2,8 mM	60 min	0,1 - 0,2 mM ≙ 80 µCi/ml	2-maliges Waschen
Sehlin 1974	ob/ob Maus	?	KRB-Lösung Glucose 3 mM	120 min	0,07 mM ≙ 290 Ci/mol	2 sec lang

Tabelle I : Vergleichende Literaturübersicht verschiedener methodischer Daten zur Messung von ^{86}Rubidium-fluxen in Langerhansschen Inseln

eine Perifusionsmethode - wie z.B. von Henquin, 1978 beschrieben - übergegangen.

3.2 Versuchsablauf

3.2.1 Isolierung Langerhansscher Inseln nach Lacy und Kostianovsky, 1967

3.2.1.1 Präparation des Pankreas

Die Ratte wurde mit Ether narkotisiert, sodann durch einen Längsschnitt von der Beckenregion bis zum Brustbein sowie je einen Querschnitt in Becken- und in Rippenhöhe das Abdomen geöffnet. Mit einer Pinzette wurde das Duodenum unter den Leberlappen hervorgezogen, so daß der Ductus pancreaticus sichtbar wurde und mit einem Faden möglichst nahe an der Leber abgebunden werden konnte. Zusätzlich wurde das Duodenum in Richtung Magen abgeklemmt. Durch den Ductus pancreaticus wurden nun 10 ml eisgekühlte Hanks Lösung injiziert. Das durch diesen Vorgang gut sichtbar aufgeblähte Pankreas konnte mit einer Schere von Magen, Leber, Darm und Milz abgetrennt werden; es wurde sofort in eine mit eisgekühlter Hanks Lösung gefüllte Petrischale gelegt, 2 mal gespült, und sodann sorgfältig von anhängendem Fettgewebe befreit.

3.2.1.2 Isolierung der Langerhansschen Inseln

Das Pankreas wurde mit einer Schere gleichmäßig und so fein zerschnitten, daß sich die Teilchen durch den Konus einer 5 ml Rekordspritze aufsaugen ließen. Nach Entfernung der überstehenden Flüssigkeit und obenauf schwimmender Fettpartikelchen wurde das Gewebe aus der Spritze in ein 20 ml Schnappdeckelglas übergeführt, in dem sich 30 mg Collagenase befanden. In einem Schüttelwasserbad ließ man die Collagenase unter kräftigem Schütteln so lange auf die Pankreaspartikel einwirken, bis eine homogene hellbraune, schleimige Flüssigkeit entstanden war (ca. 7 - 14 min, je nach Aktivität der Collagenase und der Größe der Pankreaspartikel).

Zur weiteren Homogenisierung wurde sodann der gesamte Inhalt des Schnappdeckelgefäßes 3 mal noch durch den Konus einer 5 ml Rekordspritze gesaugt und wieder vorsichtig herausgepreßt und schließlich durch ein Plastiksieb in einen mit 15 ml eiskalter Hanks Lösung gefüllten Meßzylinder gegeben.
Durch die Erniedrigung der Temperatur und durch den starken Verdünnungseffekt wurde die Collagenasereaktion abgestoppt. Die Suspension schüttelte man kräftig durch und ließ sie dann zum Absetzen der Teilchen stehen.
Auf Grund der unterschiedlichen Dichte von exokrinen Partikeln einerseits und Langerhansschen Inseln andererseits war es möglich, beide voneinander durch Sedimentation zu trennen, indem man die Inseln absetzen ließ, den Überstand absaugte und erneut mit eiskalter Hanks Lösung aufschwemmte. Dieser Vorgang wurde

etwa 8 mal wiederholt, sodann wurden die Inseln unter einem Stereomikroskop mit Hilfe einer Pedersen-Mikropipette aussortiert. Alle diese Arbeitsschritte erfolgten im Eisbad.

3.2.2 Vorinkubation

Zur Equilibrierung des Stoffwechsels nach der Isolierung wurden die Inseln einer Vorinkubation unterzogen.
Dazu wurden alle Inseln in ein 5 ml Gläschen einsortiert und die Mediumsreste abgesogen. Nach Zugabe von 2 ml Vorinkubationsmedium wurde mit Carbogen begast und bei 37°C im Schüttelwasserbad langsam geschüttelt. Diese Vorinkubation dauerte 30 Minuten. Anschließend wurde der Mediumsüberstand abgesaugt und die Inseln mehrere Male in eiskalter Hanks Lösung gewaschen.

3.2.3 Beladung der Inseln mit Rubidium (Hauptinkubation)

Zur Hauptinkubation wurden aus dem kalten Hanks-Bad jeweils 20 Inseln in ein Reaktionsröhrchen einpipettiert, die miteinpipettierte Hanks Lösung dadurch entfernt, daß die Netzgefäße kurz auf eine Zellstoffunterlage gestellt wurden.
Zum Transport ins Isotopenlabor wurden alle Netzgefäße in ein kleines Becherglas, gefüllt mit KRB, Glucose 3 mM, RSA 5 ‰, gestellt.
Dort wurde dieses Transportmedium wieder abgesogen, die Netzgefäße in die Inkubationsgefäße gestellt und je 0,7 ml des Haupt-

inkubationsmediums (2.5.2) einpipettiert.
Die Hauptinkubation wurde in einem Schüttelwasserbad bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Eine Begasung mit Carbogen war dadurch sichergestellt, daß über den gesamten Reagenzglasständer eine Plexiglashaube gestülpt wurde, in die ein gleichmäßiger Carbogenstrom geleitet wurde.

3.2.4 Waschvorgang

Nach Beendigung der Hauptinkubation wurden die Netzgefäße aus den Inkubationsröhrchen genommen, die überstehende Flüssigkeit mit Hilfe einer Zellstoffunterlage abgesaugt.
Danach wurden die Röhrchen durch 2-maliges Einpipettieren und Wiederabsaugen von je 0,5 ml Waschmedium vom Großteil der am Netz und am Inselmaterial haftenden Aktivität befreit.

3.2.5 Effluxmessung

Zur Bestimmung des Einflusses verschiedener Glucosekonzentrationen und verschiedener anderer Substanzen wurden die nun mit Rubidium beladenen, 2 mal gewaschenen Inseln, die sich noch in den Netzgefäßen befanden, in Inkubationsgefäße gestellt, wohinein zuvor die verschiedenen Effluxmedien (2.5.4) pipettiert worden waren.
Diese Inkubation dauerte 10 Minuten. Sie wurde analog der Hauptinkubation bei 37°C durchgeführt - im Schüttelwasserbad unter Carbogenbegasung.

Nach Beendigung dieser Inkubation wurden die Reaktionsröhrchen aus den Inkubationsgefäßen entfernt, sowie überstehendes Medium abgesogen.

3.2.6 Bestimmung des 86-Rubidiumgehaltes in den Inseln

Die Netze wurden mit Hilfe einer Pinzette vom Reaktionsröhrchen abgezogen und in ein Szintillationsgläschen übergeführt. Nach dem Auftropfen von 20 µl Hyaminhydroxidlösung auf das Netz wurden nach kurzer Einwirkungszeit 16 ml Unisolve I zugesetzt, das Szintillationsgläschen zugeschraubt, mehrmals geschüttelt und kurze Zeit (ca. 10 Minuten) stehengelassen.

Die Lösung wurde sodann vorsichtig in ein zweites Szintillationsgefäß vom Netz abdekantiert, da sich gezeigt hat, daß das Netz Radioaktivität in unterschiedlichem Maße bindet und so eine exakte Bestimmung des Rubidiumgehaltes in der Insel stört.

3.2.7 Messung und Berechnung der 86-Rubidiumkonzentration in der Insel

a) Messung

86-Rubidium ist ein Radionuklid, das gleichzeitig ß-Strahlung als auch y-Strahlung aussendet.

86-Rb

ß : 0,69 MeV (8,8 %)

1,77 MeV (91,2 %)

y : 1,077 MeV (8,8 %)

Seine Halbwertszeit beträgt 18,7 Tage (Firma Amersham Buchler, Braunschweig).

Zur Messung wurde die ß-Strahlung von 86-Rubidium ausgenutzt.

Als Meßgerät stand ein PACKARD TRI CARB mod 3385, Liquid Scintillation Spectrometer zur Verfügung.

Die Meßzeit der Proben betrug generell 1 Minute.

Es wurde bei offenem Meßfenster in einem Bereich zwischen 50 und 1000 Skalenteilen gemessen, die Verstärkung betrug 1 %.

Bestimmung der efficiency in diesem Meßbereich

Eine Aussage über die efficiency erhält man durch den Vergleich der nach dem Kalibrierungsdatum berechneten Zerfälle pro Minute (dpm) und den gemessenen Counts pro Minute (cpm) der Probe.

Hierbei ergab sich eine efficiency von :

$$\frac{477225 \text{ cpm}}{554691 \text{ dpm}} \times 100 \% = 86{,}03 \%$$

Zum Vergleich wurde die efficiency in den anderen Kanälen des Gerätes ermittelt:

im 14-C-Kanal ergab sich eine efficiency von 21,21 %

im 3-H-Kanal ergab sich eine efficiency von 4,39 %

im 32-P-Kanal ergab sich eine efficiency von 1,49 %

Ausschluß von Störfaktoren auf die Messung

Da das Inselmaterial mit 20 µl Hyaminhydroxidlösung aufgelöst wurde, mußte in einer besonderen Meßreihe sichergestellt werden, daß Hyaminhydroxid - zumindest in dieser zugesetzten Menge - die Messung nicht beeinflußt.
Dazu wurden jeweils 10 µl Hauptinkubationsmedium mit steigenden Mengen an Hyaminhydroxid versetzt (von 0 - 500 µl), 16 ml Unisolve I zugegeben und

a) sofort

b) nach 24 Stunden gemessen.

Die Meßzeit betrug 1 Minute.

Ergebnis: Die cpm-Werte schwankten, nicht linear

a) von min. 283329 bis max. 332018 Diff. 48689

b) von min. 278626 bis max. 337739 Diff. 59113

Schlußfolgerung :

Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen ist 86-Rb in dieser Meßanordnung ohne statistisch auswertbaren Quencheffekt meßbar.

b) Berechnung

Um die Ergebnisse verschiedener Versuchstage miteinander vergleichen und um die Werte statistisch berechnen zu können, wurden bei jedem Versuch interne Standards verwendet.
Hierzu wurden jeweils 10 µl des Hauptinkubationsmediums abpi-

pettiert, mit 16 ml Unisolve I versetzt und im weiteren Verlauf genauso wie die anderen Proben gehandhabt.
Diese internen Standards waren Bezugspunkt für die Berechnung der Inselgehalte an Rubidium am jeweiligen Versuchstag.
Die Ergebnisse wurden in pmol aufgenommenes Rubidium pro Insel ausgedrückt.

Die Berechnung wurde nach folgendem Schema durchgeführt:
aufgenommenes Rubidium pro Insel (pmol) =

$$\frac{\text{cpm der Probe x Rb-Gehalt des internen Standards (pmol)}}{\text{cpm des internen Standards x 20*}}$$

*Faktor 20, da jede Probe aus 20 Langerhansschen Inseln besteht

3.2.8 Versuche zur Insulinsekretion

3.2.8.1 Versuchsablauf

Vorinkubierte Inseln wurden in Gruppen a' 5 Inseln in Reaktionsröhrchen einpipettiert, überstehendes Medium abgesogen und in jeweils 0,7 ml Inkubationsmedium - wie bei den einzelnen Versuchen angegeben - gestellt.
Die Inkubation wurde 90 Minuten lang unter ständiger Carbogenbegasung bei 37°C im Schüttelwasserbad durchgeführt.

Man beendete die Inkubation dadurch, daß nach Ablauf von 90 Minuten die Reaktionsröhrchen aus den Inkubationsgefäßen entfernt wurden.

Jeweils 0,1 ml des Inkubationsmediums wurden nach kurzem Schütteln entnommen und im Gefrierschrank bei Temperaturen von unter -25°C bis zur Insulinbestimmung aufbewahrt.

3.2.8.2 Radioimmunologische Bestimmung von Insulin

Die Insulinkonzentration im Inkubationsmedium wurde durch Radioimmunoassay in Doppelbestimmungen nach der Doppelantikörpermethode (Soeldner und Slone, 1965) mit dem INSIK^{R}-Kit bestimmt.

Durchführung der Bestimmung

Da die Insulinkonzentrationen in 0,1 ml des Inkubationsmediums für diese Bestimmung zu hoch waren, wurden die Proben mit je 0,9 ml des folgenden Puffers verdünnt:

$NaH_2PO_4 \times H_2O$	550 mg
Rinderserumalbumin	100 mg
Aqua bidest.	ad 100 ml

Diese Lösung wurde mit NaOH 1n auf pH 7,4 eingestellt.

Von den auf diese Weise erhaltenen Proben mit Volumen 1,0 ml wurden jeweils 0,1 ml für die Bestimmung entnommen und in zuvor durchnummerierte Polystyrolröhrchen einpipettiert.

Ebenso wurde eine Eichkurve im Bereich zwischen 0 und 2000 µE IRI/ml mit Ratteninsulin erstellt. Als Nullpunkt der Eichkurve wurden 0,1 ml des oben angegebenen Puffers vorgelegt.

Der lyophilisierte Antikörper wurde gemäß der Vorschrift gelöst und jeweils 0,1 ml davon zu den Proben gegeben, diese sorgfältig durchmischt und für 6 Stunden bei +4°C (Kühlschrank) gehalten.

Anschließend wurden zu jeder Probe 0,1 ml des gelösten 125-I-markierten Insulins zupipettiert und dieser Ansatz für 18 Stunden bei +4°C inkubiert.

Nach dem Verdünnen jeder Probe mit 1,0 ml des obigen Phosphatpuffers wurden alle Teströhrchen 20 Minuten lang bei 3500 U/min bei +4°C zentrifugiert, sodaß anschließend der Überstand von dem am Boden haftenden Doppelantikörperkomplex abdekantiert werden konnte. Eventuell am Gläschen haftende Tröpfchen wurden mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Die Messung der Proben erfolgte in einem automatischen Gamma-Zähler. Die Zähldauer wurde so eingestellt, daß die Proben für den Nullpunkt der Eichkurve, die ausschließlich markiertes Insulin enthielten, ca. 6000 counts aufwiesen. Mit dieser ermittelten Zählzeit, meist 1 Minute, wurden alle Proben gemessen.

3.2.8.3 Berechnung des sezernierten Insulins

Aus den Doppelbestimmungen jeder Probe ließ sich die Durchschnittszählrate ermitteln.

Man bildete den Quotienten aus der jeweiligen Durchschnittszählrate der Proben und der Zählrate des Leerwertes.

Anhand der ebenfalls auf diese Weise erstellten Eichkurve konnte nun entweder aus der graphischen Darstellung der Eichkurve

der Insulingehalt der Meßprobe ermittelt werden oder aber mit Hilfe eines Computerprogrammes die Insulingehalte der Meßproben errechnet werden.
Da sich die ermittelten Werte auf ein Probenvolumen von 0,1 ml beziehen, das Inkubationsmedium aber 0,7 ml betrug, erhielt man die Konzentration in µE IRI/ml durch Multiplikation mit dem Faktor 7.

3.2.9 Veränderungen der Methodik und Einführung einer Perifusionsmethode

Die nachfolgend aufgeführten Veränderungen der Methode wurden im Anschluß an einen Besuch im Laboratorium von Dr. Henquin in Brüssel durchgeführt, dessen Perifusionsmethode auch in unserem Arbeitskreis eingeführt wurde.

3.2.9.1 Präparation des Pankreas

Wie unter 3.2.1 beschrieben, mit dem Unterschied, daß statt eisgekühlter Hanks Lösung nun KRB-Lösung von Raumtemperatur verwendet wurde.

3.2.9.2 Isolierung der Langerhansschen Inseln

Wie unter 3.2.1.2 beschrieben, mit dem Unterschied, daß nach dem Einwirken der Collagenase nun nicht eisgekühlte Hanks-Lö-

sung, sondern, wie oben beschrieben, KRB-Lösung von Raumtemperatur dem Ansatz hinzugefügt wurde. Ein Abtrennen der Collagenase und ein vollständiges Stoppen des Verdauungsvorganges wurde durch 3-maliges kurzes Zentrifugieren des Inkubates, Dekantieren des Überstandes (der die Collagenase enthielt) und erneutem Zufügen von ca. 20°C warmer KRB-Lösung erreicht.
Das Aussortieren der Inseln fand ebenso bei Raumtemperatur statt. Es wurde nicht, wie unter 3.2.1.2 beschrieben, mit einer Pedersenpipette, sondern mit einer silikonisierten Pasteurpipette, die verkürzt und deren Öffnung damit erweitert worden war, aussortiert, um eine evtl. mechanische Verletzung der Inseln zu vermeiden.

Begründung für die Veränderung der Methodik:

Wie in anderen Laboratorien (Henquin, persönliche Mitteilung) gezeigt werden konnte, hat die Verwendung von KRB-Lösung (Raumtemperatur) gegenüber der Verwendung von Hanks-Lösung keinerlei Nachteile (Parameter Insulinsekretion). Vielmehr ist es für den Experimentator eine große Erleichterung, die Isolierung der Inseln bei Raumtemperatur vornehmen zu können.
Es ist weiterhin eine Erleichterung, für "Isolierungsmedium" und "Inkubationsmedium" eine Rezeptur zu benutzen, anstatt 2 verschiedene Ansätze machen zu müssen.

3.2.9.3 Vorinkubation

Für Versuche zum Rubidiumefflux wurde auf die Vorinkubation verzichtet, da die Stoffwechselleistung der Inseln während der Isolierung keine Änderung erfahren hatte (Raumtemperatur, gleiches Medium) und damit keine Phase der Regeneration notwendig war (Henquin, persönliche Mitteilung).

3.2.9.4 Inkubation zur Rubidiumaufnahme (= Hauptinkubation)

Zur Hauptinkubation wurden jeweils genau 40 Inseln (die nachher in eine Kammer einsortiert wurden) in ein Reagenzglas eingelesen, überstehendes Medium bis auf einen kleinen Rest abgesaugt, 250 µl KRB-Lösung und jeweils so viel der 86-Rubidiumstammlösung zugesetzt, daß eine Endkonzentration von ca. 0,2 mM (= 20-30 µl 86-Rubidiumlösung) im Ansatz erreicht wurde.
Danach wurde die sich in den Reagenzgläsern befindliche Luft durch Einleiten eines kräftigen Carbogenstromes verdrängt. Das Gefäß wurde sofort mit einem Gummistopfen fest verschlossen und für 90 Minuten in einem Schüttelwasserbad bei 37°C belassen.

3.2.9.5 Waschvorgang

Nach Beendigung der Hauptinkubation wurde das überstehende Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Inseln 3 mal mit 5 ml KRB-Lösung, Glucose 3 mM, RSA 5 ‰ gewaschen.
Danach wurden mit einer silikonisierten Pasteurpipette, deren

Spitze abgetrennt worden war, um die Öffnung zu vergrößern, die Inseln aus dem Reagenzglas auf ein kleines Uhrglas mit schwarzem Untergrund überführt.
Die Inseln wurden nun durch leicht kreisende Bewegungen des Uhrglases in zentrale Lage gebracht und konnten so leicht - da mit dem bloßen Auge gut erkennbar - wiederum mit einer silikonisierten Pasteurpipette in die vorbereitete Perifusionskammer (2.7.2) überführt werden.

3.2.9.6 Perifusion

Die Kammer wird nach oben hin verschlossen, indem ein Membranfilter von 25 mm Durchmesser mit einer Pinzette aufgelegt wird, das sofort von Medium benetzt wird.
Der Deckel, der zuvor am Rande mit Silikonfett leicht eingestrichen wurde, wird aufgesetzt und festgeschraubt. Sodann wird die Schlauchpumpe eingeschaltet.
In allen Versuchen wird der Zeitpunkt, bei dem zum ersten Mal zu den mit 86-Rb beladenen Inseln Waschmedium (s.o.) zugesetzt wird, als der Zeitpunkt t = 0 Minuten bezeichnet.
Es hat sich gezeigt, daß Waschvorgang, Einlesen der Inseln in die Kammer und Verschließen der Kammer ca. 12 - 15 Minuten in Anspruch nimmt.
Weiterhin ist bekannt (Henquin, 1979), daß das sich im Extrazellulärraum befindliche 86-Rb nach ca. 8 - 10 Minuten ausgewaschen ist.
Dementsprechend wurde erst bei t = 20 Minuten mit dem Sammeln

und Auswerten der Fraktionen begonnen, obschon sofort nach Einsetzen der Inseln und Verschließen der Kammer mit der Perifusion begonnen wurde.

Bei t = 20 Minuten wurde der Fraktionssammler eingeschaltet, alle 2 Minuten wurden die Fraktionen gewechselt. Das Effluat wurde in Minivials aufgefangen.

Von t = 20 Minuten bis t = 40 Minuten wurden die Kammern mit Medium I durchströmt, das, sofern nicht anders angegeben, aus KRB-Lösung, Glucose 3 mM, RSA 5 ‰ bestand.

Zum Zeitpunkt t = 40 Minuten schaltete man auf das Medium II, das die zu untersuchenden Substanzen gelöst enthielt, um; dieses Medium wurde bis zum Zeitpunkt t = 70 Minuten als Perifusionsmedium belassen.

Bei t = 70 Minuten wurde wiederum auf das Medium I umgeschalten, um eine Reversibilität eines evtl. mit Medium II erzielten Effektes zeigen zu können.

Bei t = 90 Minuten wurden Schlauchpumpe und Fraktionssammler abgeschaltet, der Deckel durch Lösen der Schrauben von der Kammer abgenommen und das sich im Ableitungsschlauch befindliche Medium in einem neuen Vial gesammelt.

Vorsichtig wurde mit einer Kanüle das Membranfilter von der Kammer entfernt und in dasselbe Vial gegeben.

Die Inseln wurden sodann durch leichtes Aufwirbeln in der Kammer mit Hilfe einer Pasteurpipette angesaugt und in ein weiteres Vial pipettiert. Durch Anschalten der Schlauchpumpe wurde neues Medium in die Kammer gepumpt und dieses ebenfalls nach mehrmaligem Hin- und Herspülen in der Kammer in dieses Vial gegeben. Auf diese Weise wurden die Langerhansschen Inseln quan-

titativ aus der Kammer entfernt.
Zu allen Proben, die nun 2,4 ml Medium enthielten (= 2 min a 1,2 ml) wurden 2,6 ml Unisolve I zupipettiert, die Minivials verschlossen, geschüttelt und nach entsprechender Zeit (mindestens 1 Stunde, um Lichteffekte abklingen zu lassen) in einem ß-Counter gezählt.
Ebenso verfuhr man mit den Vials, die das Filter bzw. die Inseln enthielten.

3.2.9.7 Berechnung der Effluxrate

Grundlage bilden die von dem an den Counter angeschlossenen Drucker ausgedruckten Countzahlen für die verschiedenen Proben sowie die Countzahlen für die Filterprobe und für die die Inseln enthaltende Probe (= Inselprobe).
Zunächst wird die Summe aus Filterprobe und Inselprobe gebildet. Diese Summe stellt den Teil der Aktivität, d.h. des 86-Rb, dar, die bei Versuchsende noch in den Inseln bzw. im System ist.
Nun wird - von der letzten Probe her beginnend - der Quotient gebildet aus

$$\frac{\text{Counts Probe \$}}{\text{Counts Filterprobe + Counts Inselprobe + Counts Probe \$}}$$

Der Nenner stellt also die Summe der Aktivität dar, die zu dem Zeitpunkt, da die Probe $ genommen wurde, sich in den Inseln und im System befand, d.h. bei der Berechnung der vorletzten

Probe sind im Nenner die Countzahlen der letzten + vorletzten Probe zu berücksichtigen usw.
Dieser erhaltene Quotient multipliziert mit 100 % und dividiert durch den Faktor 2 (da ja alle 2 Minuten Proben genommen wurden, die Maßzahl aber %/min ist) ergibt die Effluxrate, ausgedrückt in %/min, der zu dieser Zeit sich in den Inseln befindlichen Aktivität.
Bei der Berechnung sowie bei der graphischen Auswertung der Versuche wurde die Totzeit des Systems nicht berücksichtigt.

3.2.9.8 Statistische Auswertung

Um die Effekte verschiedener Substanzen auf den 86-Rubidiumefflux Langerhansscher Inseln quantifizieren zu können, und verschiedene Substanzen hinsichtlich ihrer Beeinflussung des 86-Rubidiumeffluxes miteinander vergleichen zu können, mußte eine Hilfsgröße eingeführt werden, die ein Maß für den Hemmeffekt einer Substanz auf den 86-Rubidiumefflux darstellt.
In der Literatur findet sich kein einheitliches Auswertverfahren. Von vielen Autoren, die sich mit dem 86-Rubidiumefflux beschäftigen, wird auf eine rechnerische Auswertung der erhaltenen Effluxkurven verzichtet (Malaisse et al., 1978; Henquin und Meissner, 1978, 1982).
Als Maß für den Einfluß einer Substanz auf die Kaliumpermeabilität wird auch angegeben, wieviel - prozentual ausgedrückt - die Effluxrate einer Kurve mit untersuchter Substanz zu einem bestimmten Zeitpunkt im Vergleich mit der Effluxrate der Ver-

gleichskurve beträgt (Charles et al., 1982; Sener et al., 1978). Hier gibt also eine erhaltene Zahl > 100 % eine Steigerung, < 100 % eine Hemmung des 86-Rubidiumeffluxes an.
Des weiteren werden Effekte als Differenzen zwischen Effluxraten während der Stimulation und Effluxraten vor der Stimulation angegeben. Diese Differenzen werden dann den Daten der Vergleichskurve gegenübergestellt (Carpinelli und Malaisse, 1980, 1981).
Eine elegante Methode, die im Unterschied zu den beiden bisher genannten Verfahren die absoluten Effluxraten nicht zu berücksichtigen braucht, wird von Lindström und Sehlin, 1982 beschrieben. Hier wird der Quotient gebildet aus Effluxrate während der Stimulation und Effluxrate vor der Stimulation, gibt also ein Maß für die relative Hemmung oder Vergrößerung des 86-Rubidiumeffluxes durch eine Substanz an. Übt eine Substanz einen hemmenden Effekt auf den 86-Rubidiumefflux aus, so wird gefunden, daß der Quotient (Substanz) kleiner ist als Quotient (Vergleich), hat die Substanz aber eine Vergrößerung des 86-Rubidiumeffluxes zur Folge, so ist das Verhältnis der Quotienten umgekehrt.
Diese Methode wurde auch in der vorliegenden Arbeit angewandt. Zunächst wurden die Mittelwerte aus den Effluxraten der Fraktionen 19, 20, 21, d.h. Minuten 38 - 42 der Perifusion, d.h. Minuten 18 - 22 der Stimulationsphase und der Fraktionen 8, 9, 10, d.h. Minuten 16 - 20 der Perifusion direkt vor dem Umschalten auf Medium II (= Stimulationsmedium) gebildet.
Die jeweils auf diese Weise erhaltenen Quotienten wurden anschließend - um Unterschiedlichkeit zu prüfen - im Student-t-test bzw. mit Varianzanalyse miteinander verglichen.

3.3 Versuche zur Aufnahme von 86-Rb in Langerhanssche Inseln

Voraussetzung für eine Betrachtung der Rubidiumfluxe an isolierten Langerhansschen Inseln ist eine entsprechende Vorbeladung der Inseln mit dem radioaktiv markierten Isotop.

Deshalb galt es zunächst, eine Versuchsanordnung zu erstellen, mit Hilfe derer Inselgruppen mit 86-Rb beladen werden können.

3.3.1 Ausgangsbedingungen

Die vorbereiteten Inselgruppen (3.2.2, 3.2.3) wurden in folgendes Hauptinkubationsmedium eingebracht:

KRB, Glucose	3 mM
RSA	5 ‰
86-Rb	0,19 mM

Nach verschiedenen Zeiten (sofort, nach 60, 90 und 120 Minuten) wurden Inselgruppen aus dem Hauptinkubationsmedium entfernt und je 1 mal mit 0,5 ml folgenden Mediums gewaschen:

KRB, Glucose 3 mM, RSA 5 ‰

Ergebnis: (ausgedrückt in pmol 86-Rb/Insel)

Zeit	I	II	III
0 min	0,124	0,244	0,418
60 min	1,529	2,090	0,674
90 min	0,515	1,270	0,674
120 min	0,894	1,270	0,526

Inkubation: 20 Langerhanssche Inseln in 0,7 ml KRB, Glucose 3 mM, RSA 5 %, 86-Rb 0,19 mM
Werte aus 3 Einzelversuchen

Auch wurden bei diesem Versuch Leernetze (ohne Inseln) mitinkubiert:

Ergebnis: (ausgedrückt in cpm/Netz)

Netz	1	2	3	4	5	6	7
cpm	4030	723	125	2264	4369	3941	812

Schlußfolgerung:

Da sowohl der Gehalt der Inseln an 86-Rb bei gleicher Inkubationszeit um mehr als den Faktor 3 schwankte, als auch die Leernetze einen stark streuenden Gehalt an anhaftender Radioaktivität aufwiesen, galt es zunächst einmal, den Background der Netze zu vereinheitlichen.

Deshalb wurden im folgenden zunächst Waschversuche nur mit leeren Netzen durchgeführt.

3.3.2 Variation des Waschvorganges bei Leernetzen

Folgende Parameter wurden verändert:

a) Häufigkeit der Waschung (1 oder 2 mal)

b) Menge der Waschflüssigkeit pro Waschvorgang (0,25 ml oder 0,5 ml)

c) Änderung der Zusammensetzung der Waschflüssigkeit (mit oder ohne RSA)

Dabei zeigten sich folgende Ergebnisse:

Waschmedium Waschvorgang	I	II	III	IV	$\bar{x}$ ± SEM
KRB, RSA 5 ‰ 1 mal 0,5 ml	2134	3086	1214	266	1675 ± 605
KRB, ohne RSA 1 mal 0,5 ml	809	987	6250	7902	3987 ± 1815
KRB, RSA 5 ‰ 2 mal 0,25 ml	1974	2334	496	2518	1830 ± 459
KRB, ohne RSA 2 mal 0,25 ml	986	743	655	370	688 ± 127
KRB, RSA 5 ‰ 2 mal 0,5 ml	379	627	4921	1109	1759 ± 1065
KRB, ohne RSA 2 mal 0,5 ml	142	287	1420	565	603 ± 286

Inkubation: Leernetze in 0,7 ml KRB, Glucose 3 mM, RSA 5 ‰, 86-Rb 0,19 mM
Inkubationszeit: t = 60 min
Werte und Mittelwert aus 4 Einzelversuchen, in cpm/Netz angegeben

Es läßt sich aus dieser Übersicht erkennen, daß eine Verbesserung der Werte erzielt wurde

a) durch häufigeres Waschen (2 mal besser als 1 mal)

b) durch die Verwendung eines Waschmediums ohne Rinder-

serumalbumin; es scheint so zu sein, daß das Makromolekül Rinderserumalbumin Radioaktivität, d.h. 86-Rb, bindet und wohl auch während des Waschvorgangs am Netz verbleibt und somit für den Fehler - für die breite Streuung der Werte - verantwortlich ist.

Trotzdem waren diese Werte noch nicht zufriedenstellend, da auch bei der besten Versuchsgruppe aus obiger Tabelle die Streubreite der Werte noch zu groß war.

Ein weiterer Schritt war deshalb, auch im Hauptinkubationsmedium das Rinderserumalbumin wegzulassen.
Zunächst einmal im Netzleerversuch überprüft, ergab sich folgendes:

Hauptinkubationsmedium: KRB, Glucose 3 mM, 86-Rb 0,19 mM

Inkubationszeit: t = 60 min

Waschvorgang: 2 mal mit je 0,5 ml KRB, Glucose 3 mM

	I	II	III	IV	V	$\bar{\theta}$ ± SEM
Hauptinkub. mit RSA	80	186	249	67	273	171 ± 42,3
Hauptinkub. ohne RSA	236	49	84	80	—	112 ± 41,9

Leernetze in 0,7 ml KRB, Glucose 3 mM, 86-Rb 0,19 mM
Inkubationszeit: t = 60 min
Werte und Mittelwert aus 5 bzw. 4 Einzelversuchen, in cpm/Netz angegeben

Auch eine intensivere Waschung konnte den Fehler, der durch ein Hauptinkubationsmedium mit Rinderserumalbumin verursacht wird, nicht ausschalten:

Hauptinkubationsmedium: KRB, Glucose 3 mM, RSA 5 %,
86-Rb 0,19 mM

Inkubationszeit: t = 60 min

Waschen	I	II	III	IV	$\bar{\theta}$ ± SEM
3 mal mit 0,3 ml	494	4407	579	1319	1699,7 ± 921,2
3 mal mit 0,5 ml	107	515	279	6652	1888,3 ± 1590,1

Leernetze in 0,7 ml KRB, Glucose 3 mM, RSA 5 % 86-Rb 0,19 mM
Inkubationszeit: t = 60 min
Werte und Mittelwert aus 4 Einzelversuchen, in cpm/Netz angegeben

Schlußfolgerung:

Durch Elimination von RSA im Hauptinkubationsmedium konnte - zumindest bei leeren Netzen - die Streuung der Werte verkleinert werden.

3.3.3 Übertragung der Ergebnisse aus den Leerversuchen auf Versuche mit Inselmaterial

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse und Schlußfolgerungen wurde nun auch eine Inkubation ohne RSA im Medium mit Inselmaterial durchgeführt und zwar zunächst einmal nur bei einer Inkubationszeit von 0 Minuten, um feststellen zu können, ob das RSA wirklich der eigentliche Störfaktor (siehe 3.3.1) war, oder ob das Inselmaterial an sich auch uneinheitlich viel 86-Rb bindet.

Ergebnis: (in pmol 86-Rb/Insel angegeben)

	I	II	III	IV	$\bar{\theta}$ ± SEM
Inkub. mit RSA 5 ‰ Inkubat. zeit t = 0 min	0,127	0,054	0,014	0,022	0,054 ± 0,025
Inkub. ohne RSA Inkubat. zeit t = 0 min	0,023	0,015	0,030	0,030	0,024 ± 0,003

Inkubation: 20 Langerhanssche Inseln in 0,7 ml KRB, Glucose 3 mM, RSA wie angegeben, 86-Rb 0,19 mM
Waschvorgang: 2 mal 0,5 ml KRB, Glucose 3 mM
Werte und Mittelwert aus 4 Versuchen

Schlußfolgerung:

Eindeutig besser, d.h. einheitlicher, lagen die Werte, bei denen das Hauptinkubationsmedium kein RSA enthielt, das heißt, daß durch Entfernen von RSA aus dem Hauptinkubationsmedium der eigentliche Störfaktor beseitigt werden konnte.

3.3.4 Waschmedium mit Glucose 16,7 mM

Von allen Autoren, die sich mit der Messung der Rubidiumfluxe an Langerhansschen Inseln beschäftigen (Tabelle I), wird Wert auf die Tatsache gelegt, daß der Waschvorgang möglichst kurz durchgeführt wird, wohl um ein Auswaschen von zuvor aufgenommenem Rubidium aus der Insel zu vermeiden.
Da in unserem System - bedingt durch den engen Durchmesser der Reaktionsröhrchen - der Waschvorgang im Vergleich zu anderen Autoren (z.B. Hellman, 1975) längere Zeit in Anspruch nimmt, wurde ein Versuch durchgeführt, in dem dem Waschmedium Glucose in einer Konzentration von 16,7 mM zugesetzt wurde.

Da bekannt ist, daß Glucose in einer Konzentration von 16,7 mM den passiven Rubidiumefflux aus der Langerhansschen Insel hemmt (Malaisse et al., 1978), kann durch Zusatz von 16,7 mM Glucose zum Waschmedium ein eventuell auftretender Auswascheffekt verhindert werden.

Ergebnis:

Waschmedium Waschvorgang	I	II	III	$\theta \pm$ SEM
KRB, Gluc. 3 mM 2 x 0,5 ml	0,588	0,144	0,408	0,380 ± 0,128
KRB, Gluc. 16,7 mM 2 x 0,5 ml	0,464	0,390	0,365	0,406 ± 0,029

Inkubation: 20 Langerhanssche Inseln in 0,7 ml KRB, Glucose 3 mM, 86-Rb 0,2 mM
Inkubationszeit: t = 60 min
Werte aus 3 Einzelversuchen und Mittelwert, jeweils in pmol 86-Rb/Insel angegeben

Schlußfolgerung:

Es konnte festgestellt werden, daß durch Verwendung von KRB, Glucose 16,7 mM als Waschflüssigkeit die Streuung der Werte verringert werden konnte.

3.3.5 Versuch mit D-6-14C-Glucose

Die oben beschriebene Waschung mit KRB, Glucose 16,7 mM konnte aber nur dann durchgeführt werden, wenn sichergestellt war, daß durch diese Behandlung nicht so viel Glucose an den Inseln oder am Netzgefäß hängen blieb, daß eine anschließende Rubidiumefflußmessung durch diese anhaftende Glucosemenge gestört werden würde.

Deshalb wurde in einem gesonderten Versuch mit radioaktiv markierter Glucose der Anteil an Glucose bestimmt, der sich nach einer Waschung mit KRB, Glucose 16,7 mM am Inselmaterial oder am Netz befindet.

Versuchsablauf:

Inselgruppen a' 20 Inseln wurden vorinkubiert, ca. 40 Minuten in KRB, Glucose 3 mM hauptinkubiert und sodann einer Waschung unterzogen und zwar

a) einer Waschung mit KRB, Glucose 3 mM, 2 mal 0,5 ml
b) einer Waschung mit KRB, Glucose 16,7 mM, 2 mal 0,5 ml

Dieses Waschmedium wurde anteilsweise mit D-6-14C-Glucose versetzt.
Der Gehalt an anhaftender Glucose errechnete sich aus dem Bezug zum internen Standard (10 µl Waschmedium).

Ergebnis:

Waschvorgang	anhaftende Menge Glucose pro Insel-gruppe in µg ± SEM	in nmol ± SEM
KRB, Glucose 3 mM	0,08 ± 0,011 (7)	0,44 ± 0,06
KRB, Glucose 16,7 mM	0,438 ± 0,105 (7)	2,44 ± 0,58

Anzahl der Einzelwerte in Klammern

Schlußfolgerung:

Auch bei einer Waschung mit KRB, Glucose 16,7 mM bleibt nur so wenig Glucose an einer Inselgruppe oder dem Netz hängen, daß

diese Menge bei Versuchen zum Rubidiumefflux keinen Einfluß hat, da das Effluxmedium selbst, das minimal 3 mM Glucose enthält, in ein Probenvolumen von 0,7 ml eine Glucosemenge von 0,378 mg Glucose mit einbringt; die anhaftende Glucose aus der Waschflüssigkeit würde also in diesem Falle einen Fehler von etwa 1 % ausmachen.
Aufgrund dieser in den vorstehenden Versuchsreihen erarbeiteten Befunde wurde in allen folgenden Versuchen die Waschung folgendermaßen durchgeführt:

2 mal mit je 0,5 ml KRB, Glucose 16,7 mM

3.3.6 Erstellen einer Aufnahmekurve für 86-Rb in Langerhanssche Inseln

Die bisher erzielten Ergebnisse wurden so weiterverfolgt, daß nun versucht wurde, eine gesamte Aufnahmekurve ohne RSA im Hauptinkubationsmedium zu erstellen.
Diese Methode steht im Einklang mit Arbeiten von Hellman, 1976 sowie den hier im Arbeitskreis durchgeführten Arbeiten zur Messung der 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln (Ammon et al., 1983).

Aus 3 voneinander unabhängigen Versuchsreihen ergab sich folgendes:

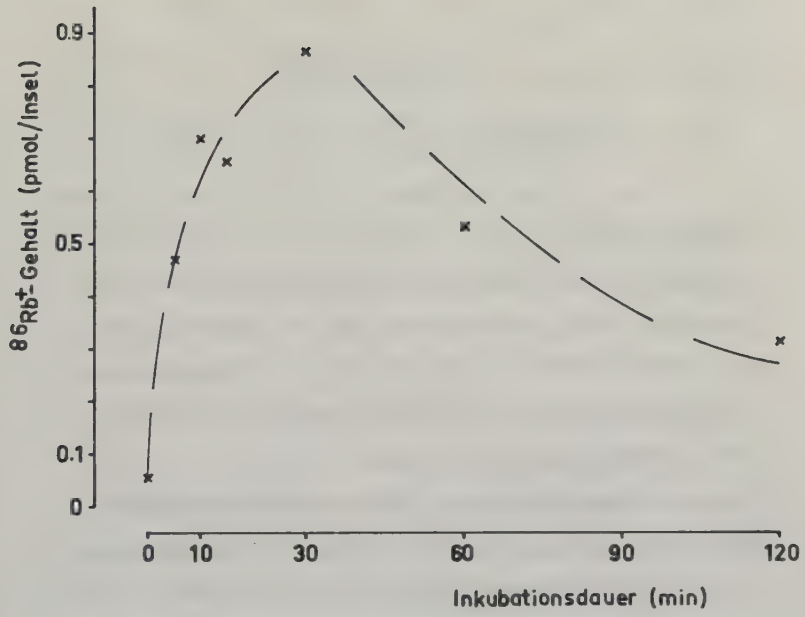


Abb. 7: ^{86}Rubidiumaufnahme in isolierte Langerhanssche Inseln

Inkubation: 20 Inseln in 0,7 ml KRB, Glucose 3 mM, ^{86}Rb 0,2 mM

Inkub. zeit (min)	0	5	10	15
Rb-Gehalt (pmol/Insel)	0,0595	0,472	0,709	0,657

Inkub. zeit (min)	30	60	120
Rb-Gehalt (pmol/Insel)	0,866	0,534	0,319

Inkubation: 20 Langerhanssche Inseln in 0,7 ml KRB, Glucose 3 mM, 86-Rb 0,2 mM

Schlußfolgerung:

Es zeigte sich eine Steigerung der 86-Rubidiumaufnahme in die Insel bis zu einer Inkubationsdauer von ca. 30 Minuten, dann aber eine Verminderung der Konzentration von 86-Rb in der Insel bis auf einen Gehalt, der unter dem liegt, der bei 5 Minuten Inkubationsdauer gemessen wurde (Abb. 7).
Solch ein Kurvenverlauf steht im Widerspruch zu den Befunden anderer Autoren (Malaisse et al., 1978; Sehlin und Täljedal, 1974), bei denen nach ca. 30 Minuten Inkubationsdauer ein Plateau erreicht wird.
Dies entspricht auch einem erwarteten Gleichgewichtszustand.

Es stellte sich daher die Frage, ob die Langerhansschen Inseln unter oben genannten Versuchsbedingungen in unserem System noch intakt waren, oder die Verminderung des 86-Rubidiumgehaltes der Inseln nach mehr als 30 Minuten Inkubationsdauer auf einem Defekt der Insel evtl. vielleicht an der Zellmembran beruht.

Um diese Frage zu klären, wurde unter gleichen Versuchsbedingungen eine Prüfung auf Intaktheit der Insel vorgenommen, indem die Insulinsekretion - als Maß für das Leben der Insel - untersucht wurde.

3.3.7 Versuche zur Insulinsekretion

Es sollte geklärt werden, ob isolierte Langerhanssche Inseln in der Lage sind, 3 Stunden in einem Medium KRB, Glucose 3 mM ohne RSA zu überleben, um anschließend auf Glucosereiz hin (16,7 mM) - genauso wie Vergleichsgruppen, die während der 3-Stunden-Phase in einem Medium, das RSA enthielt, inkubiert wurden - Insulin zu sezernieren.
Um sichergehen zu können, daß isolierte Langerhanssche Inseln in solch einem Medium bei Versuchen zum 86-Rubidiumefflux, die ca. 2 Stunden in Anspruch nehmen, überleben können, wurde eine Inkubationsphase von 3 Stunden vor der Sekretionsphase gewählt.

Da sich unser Hauptinkubationsmedium, in dem die Rubidiumaufnahme gemessen wurde, von anderen Medien, in denen Insulinsekretionen untersucht wurden (z.B. Niklas, 1978), nur durch das Fehlen von RSA unterschied, wurde auf diesen Parameter besonderen Wert gelegt und dieser genauer untersucht.

Versuchsaufbau:

Vorinkubierte Langerhanssche Inseln (3.2.2) wurden jeweils in Gruppen a' 5 Inseln in ein Reaktionsröhrchen einpipettiert und 3 Stunden lang in verschiedenen Medien inkubiert (Tabelle II). Nach dieser Zeit wurden die Reaktionsröhrchen aus den Inkubationsgefäßen entfernt, Mediumsreste abgesogen und die Reaktionsröhrchen nun in ein zweites Inkubationsgefäß gestellt.

Diese erneute Inkubation dauerte 90 Minuten. Nach dieser Zeit wurden die Reaktionsröhrchen wieder aus dem Medium entfernt sowie ein Aliquot (0,1 ml) der Inkubationslösungen nach kurzem Schütteln aus den jeweiligen Inkubationsgefäßen entnommen; in diesem Anteil wurde der Insulingehalt bestimmt.
Sämtliche Inkubationen wurden bei 37°C im Schüttelwasserbad unter ständiger Carbogenbegasung durchgeführt.

Ergebnis:

Aus den Werten, dargestellt in Abbildung 8 und Tabelle II, kann folgendes entnommen werden:

1. Isolierte Langerhanssche Inseln sind in der Lage, 3 Stunden in einem albuminfreien Medium zu überleben, um anschließend auf Glucosereiz hin Insulin zu sezernieren (B, C, D).

2. Durch die Versuchsanordnung ergeben sich Hinweise, daß der RSA-Gehalt der Medien keinen Einfluß auf die Menge des sezernierten Insulins hat (C, D).

Dieser Parameter des RSA-Gehaltes der Medien wurde in einem weiteren Versuch näher untersucht und zwar sollte die Frage geklärt werden, ob der RSA-Gehalt des Mediums einen Einfluß auf die sezernierte Insulinmenge hat, des weiteren, ob auch in RSA-freiem Medium eine Insulinsekretion stattfinden kann.
Oder anders: Ist die Anwesenheit von RSA und wenn ja in welcher Konzentration für die Insulinsekretion isolierter Langerhansscher Inseln notwendig ?

Medium Inkubation 3 Stunden	Medium Inkubation 90 Minuten	Insulinsekretion (µE IRI/ml/5Inseln) ± SEM	
KRB, Glucose 3 mM kein RSA	KRB, Glucose 3 mM RSA 2 %	32,14 ± 4,38 (5)	A
KRB, Glucose 3 mM kein RSA	KRB, Glucose 16,7 mM RSA 2 %	1086,1 ± 73,28 (5)	B
KRB, Glucose 3 mM RSA 2 %	KRB, Glucose 16,7 mM RSA 5 %.	971,1 ± 53,94 (6)	C
KRB, Glucose 3 mM RSA 5 %.	KRB, Glucose 16,7 mM RSA 5 %.	977,5 ± 94,41 (4)	D

Tabelle II: Einfluß von Rinderserumalbumin auf die Insulinsekretion isolierter Langerhansscher Inseln
Anzahl der Einzelwerte (n) in Klammern
Mean ± SEM
t-test: AB, AC, AD $p < 0.001$
BC, BD, CD n.s.

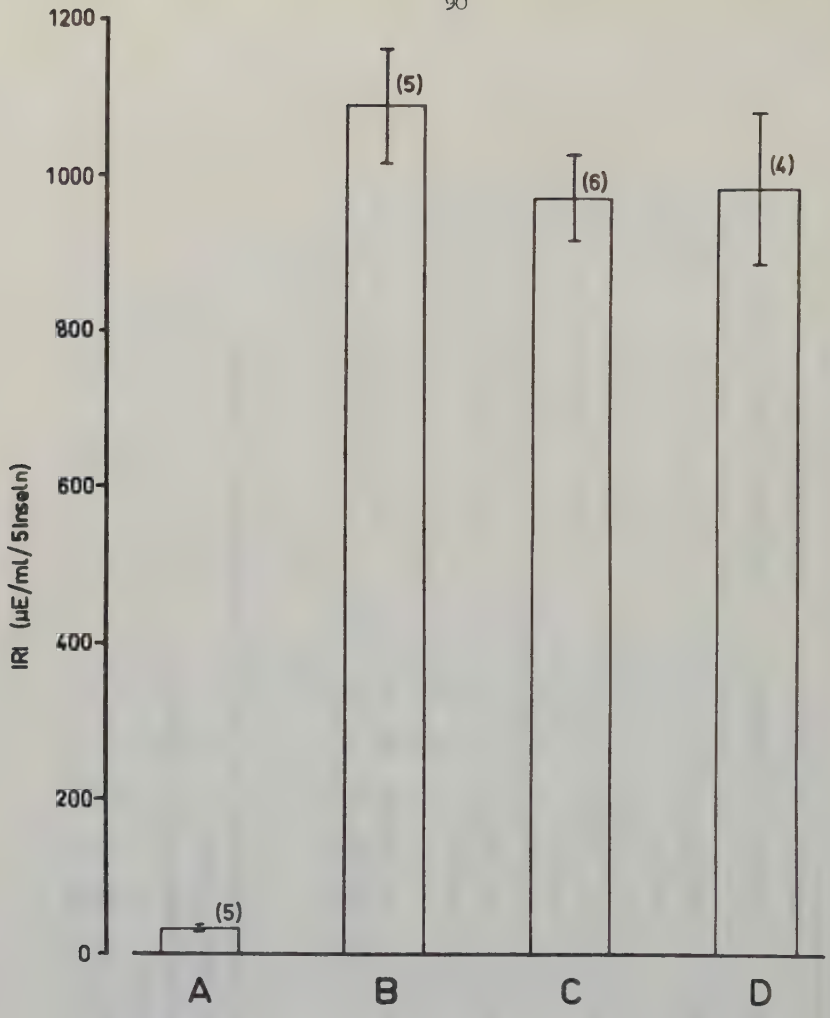


Abb. 8: Einfluß von Rinderserumalbumin auf die Insulinsekretion isolierter Langerhansscher Inseln

Inkubation: Je 5 Inseln in 0,7 ml zunächst für 3 Stunden in Medium mit Glucose 3 mM, dann Sekretionsphase für 90 Minuten. Genaue Medienzusammensetzung Tabelle II.

Anzahl der Einzelwerte (n) in Klammern

Mean ± SEM

Versuchsaufbau:

Vorinkubierte Langerhanssche Inseln wurden jeweils in Gruppen a' 5 Inseln in ein Reaktionsröhrchen einpipettiert und in Inkubationsröhrchen gestellt, in die zuvor 0,7 ml des entsprechenden Mediums (Tabelle III) einpipettiert worden waren.
Nach 90-minütiger Inkubation, die bei 37°C im Schüttelwasserbad unter Carbogenbegasung durchgeführt wurde, beendete man die Inkubation dadurch, daß die Reaktionsröhrchen aus den Inkubationsgefäßen entfernt wurden. Aus jedem Inkubationsgefäß wurde nach kurzem Schütteln ein Aliquot (0,1 ml) des jeweiligen Mediums entnommen und in diesem Anteil der Insulingehalt bestimmt.

Ergebnis:

Betrachtet man zunächst die Eichkurven (Abb. 9), die erhalten werden, wenn verschiedene Mengen Ratteninsulin in entsprechendem Medium inkubiert wurden, so läßt sich erkennen, daß

a) wenn Insulin in einem Medium KRB, Glucose 16,7 mM ohne RSA über einen Zeitraum von 90 Minuten im Schüttelwasserbad bei 37°C unter ständiger Carbogenbegasung inkubiert wird, eine gewisse Menge Insulin (ca. 650 µE/ml) so verändert bzw. auch teilweise an das Reaktionsgefäß adsorbiert wird, daß es im Radioimmunoassay nicht nachweisbar ist. Auch durch optischen Vergleich der in verschiedenen Medien inkubierten Proben läßt sich feststellen, daß diejenigen Proben, bei denen kein RSA im Medium vorhanden war, eine leichte Trübung aufweisen, die auf eine Veränderung des Insulins hindeutet.

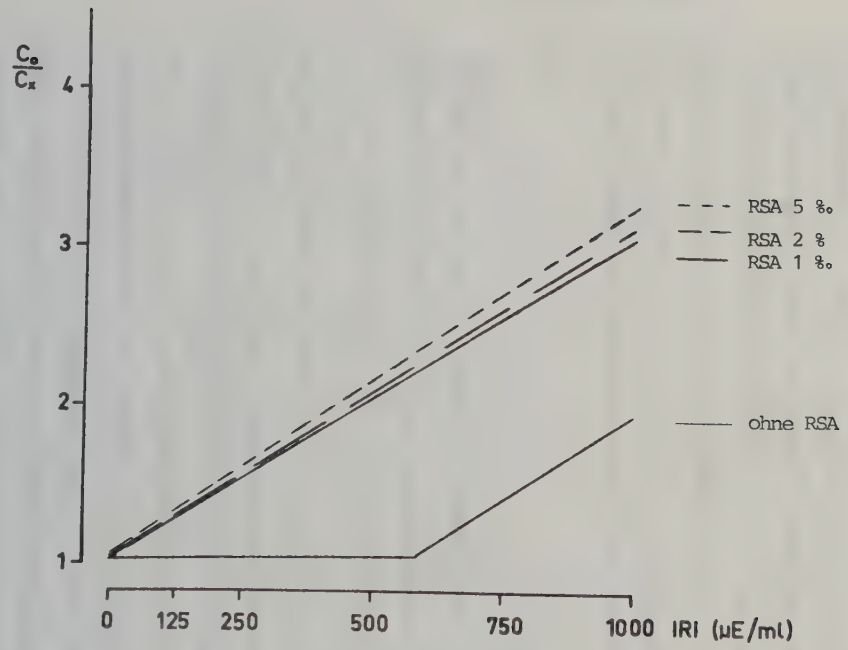


Abb. 9: Einfluß von Rinderserumalbumin auf die Bestimmung von Insulin im Radioimmunoassay.
Eichkurven

b) die Konzentration an RSA im Medium keinen meßbaren Einfluß auf die Bestimmung des eingesetzten Insulins im Radioimmunoassay hat.

Aus den Werten, dargestellt in Abbildung 10 und Tabelle III, ergibt sich, daß

a) isolierte Langerhanssche Inseln durchaus in der Lage sind, in einem Medium, das kein RSA enthält, auf Glucosereiz hin Insulin zu sezernieren. Die erhaltenen Werte lassen aber - wie am Verlauf der Eichkurve zu erkennen ist - nur in einem Bereich oberhalb von 650 µE Insulin/ml eine Aussage zu (E).

b) die RSA-Konzentration im Medium für die Menge an sezerniertem Insulin keine Rolle spielt (im untersuchten Bereich zwischen 1 ‰ und 2 %). Die Werte der Gruppen G, H und I sind nicht signifikant voneinander verschieden.

Schlußfolgerung:

Isolierte Langerhanssche Inseln sind nach 3-stündiger Inkubation in einem RSA-freien Medium noch intakt. Sie können danach noch auf physiologische Reize (z.B. Glucosestimulation) adäquat reagieren. Auch für den Vorgang der Insulinsekretion an sich ist RSA nicht erforderlich.

D.h. hinsichtlich der Versuche zur Rubidiumaufnahme in Langerhanssche Inseln, daß die Insel in diesem Medium noch intakt

Medium Inkubation 90 Minuten	Insulinsekretion (µE IRI/ml/5Inseln) ± SEM		
KRB, Glucose 3 mM RSA 5 ‰	96,44 ± 12,22	(9)	E
KRB, Glucose 16,7 mM kein RSA	736,44 ± 54,73	(6)	F
KRB, Glucose 16,7 mM RSA 1 ‰	554,53 ± 155,74	(3)	G
KRB, Glucose 16,7 mM RSA 5 ‰	738,75 ± 65,14	(5)	H
KRB, Glucose 16,7 mM RSA 2 ‰	586,47 ± 104,13	(3)	I

Tabelle III: Einfluß von Rinderserumalbumin auf die Insulinsekretion isolierter Langerhansscher Inseln
Anzahl der Einzelwerte (n) in Klammern
Mean ± SEM
t-test: EF, EG, EH, EI $p < 0.001$
FG, FH, FI, GH, GI, HI n.s.

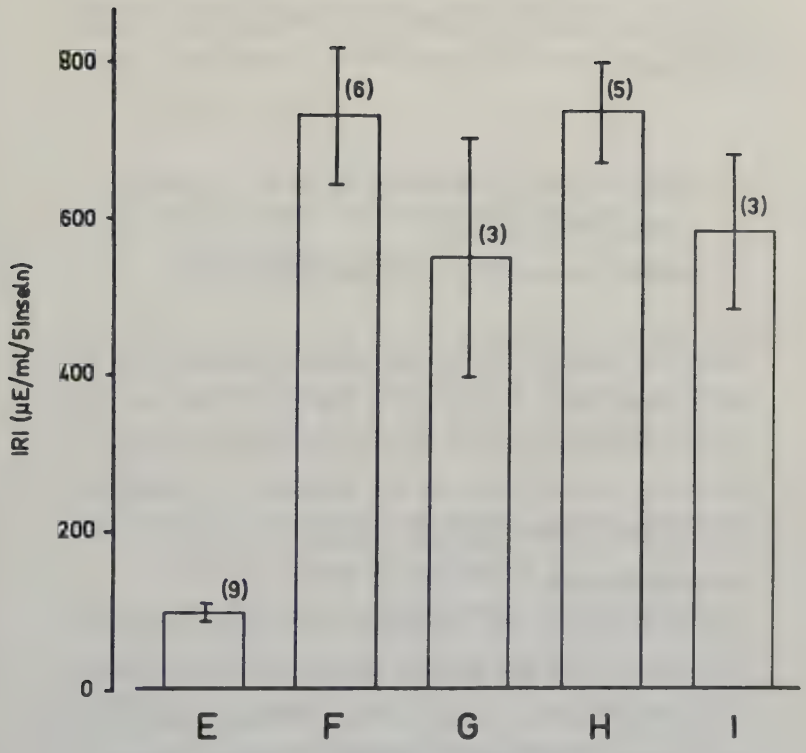


Abb. 10: Einfluß von Rinderserumalbumin auf die Insulinsekretion isolierter Langerhansscher Inseln

Inkubation: Je 5 Inseln in 0,7 ml KRB-Lösung für 90 Minuten

E Glucose 3 mM, RSA 5 %
F Glucose 16,7 mM, kein RSA
G Glucose 16,7 mM, RSA 1 %
H Glucose 16,7 mM, RSA 5 %
I Glucose 16,7 mM, RSA 2 %

Anzahl der Einzelwerte (n) in Klammern

Mean ± SEM

war; es wäre aber vorstellbar, daß RSA dennoch eine Rolle für die Rubidiumaufnahme und Erhaltung eines steady-state-Gleichgewichtes spielt.

3.3.8 Erstellen einer Aufnahmekurve für 86-Rb in isolierte Langerhanssche Inseln. Zusatz von Dextran 6 % zum Inkubationsmedium

Obwohl gezeigt wurde (3.3.7), daß isolierte Langerhanssche Inseln 3 Stunden lang in einem Medium ohne RSA so überleben können, daß sie danach noch auf einen Glucosestimulus (16,7 mM) hin Insulin sezernieren können, war es dennoch nicht möglich, in einem RSA-freien Medium einen Gleichgewichtszustand der 86-Rubidiumaufnahme zu erreichen (3.3.6).
Es erschien möglich, daß, obwohl die Insulinsekretionsleistung in Ordnung war, für den sensiblen Vorgang der Rubidiumaufnahme in die Langerhansschen Inseln durch geringfügige Änderungen in der Physiologie der Umgebung die Membran vielleicht so geschädigt wurde, daß Mechanismen, die für die Aufnahme des Rb und für die Aufrechterhaltung eines steady-state-Gleichgewichtes verantwortlich sind, in ihrer Funktion gestört waren.
Geht man von der Überlegung aus, daß die Aufgabe von RSA im Medium die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes ist, könnte diese Rolle auch von einem anderen Makromolekül als RSA, z.B. von Dextran übernommen werden.
Deshalb wurden nun im folgenden Versuche unternommen, bei denen RSA im Inkubationsmedium durch Dextran ersetzt wurde.

Für diese Versuche dienten Perfusionsversuche am isolierten Pankreas (Ammon und Abdel-Hamid, 1981) als Vorbild, bei denen das bei Inkubations- und Perifusionssystemen übliche RSA durch Dextran ersetzt wurde.

3.3.8.1 Netzleerversuch mit Dextranzusatz 6 % im Hauptinkubationsmedium

Bevor eine Inkubation von Inseln mit dem Zusatz von 6 % Dextran zum Hauptinkubationsmedium vorgenommen wurde, mußte zunächst die Störfreiheit des Dextran auf die Messung sichergestellt werden.

Dazu wurden in einem gesonderten Versuch Leernetze inkubiert

a) in einem Medium KRB, Glucose 3 mM

b) in einem Medium KRB, Glucose 3 mM, Dextran 6 %

Ergebnis:

Netz	1	2	3	4	5	6	7
a) cpm	220	101	175	215	331	114	176
b) cpm	85	72	70	109	102	85	105

Leernetze in 0,7 ml Medium (wie oben angegeben),
86-Rb 0,2 mM
Inkubationszeit: t = 60 min
Werte in cpm/Netz

Schlußfolgerung:

Es zeigte sich, daß Netze, die in einem dextranhaltigen Medium inkubiert worden waren, eine geringere Menge an Radioaktivität gebunden haben, als diejenigen Netze, die in KRB ohne Dextranzusatz inkubiert worden waren.

Der Zusatz von Dextran 6 % zum Inkubationsmedium beeinflußt im Gegensatz zu RSA 5 %.die Bestimmung von Rubidium nicht nachteilig.

3.3.8.2 Inkubation von Langerhansschen Inseln

Folgende Versuchsbedingungen wurden gewählt:

Hauptinkubationsmedium: KRB, Glucose 3 mM, Dextran 6 %,
86-Rb 0,77 mM

Gleichzeitig wurde versucht, durch eine Steigerung der Rubidiumkonzentration im Inkubationsmedium das Absinken des Rubidiumgehaltes in der Langerhansschen Insel nach einer Inkubationszeit von mehr als 30 Minuten zu verhindern.
Die Erhöhung der Rubidiumkonzentration wurde durch Zusatz von inaktiver Rubidiumchloridlösung 30 mM zur Inkubationslösung erreicht (Damit wurde trotz der Erhöhung der eingesetzten Rubidiummenge die Strahlenbelastung durch aktives Rubidium nicht erhöht).

Ergebnis:

Inkub. zeit (min)	0	5	15	30	60	90	120
Rb-Gehalt (pmol/Insel)	0,15	1,57	2,38	3,91	2,93	2,28	1,18

Inkubation: 20 Langerhanssche Inseln in 0,7 ml KRB, Glucose 3 mM, Dextran 6 %, Rb 0,77 mM

Graphische Darstellung der in diesen Versuchen ermittelten Werte:

(Vergleiche die Darstellung unter 3.3.6)

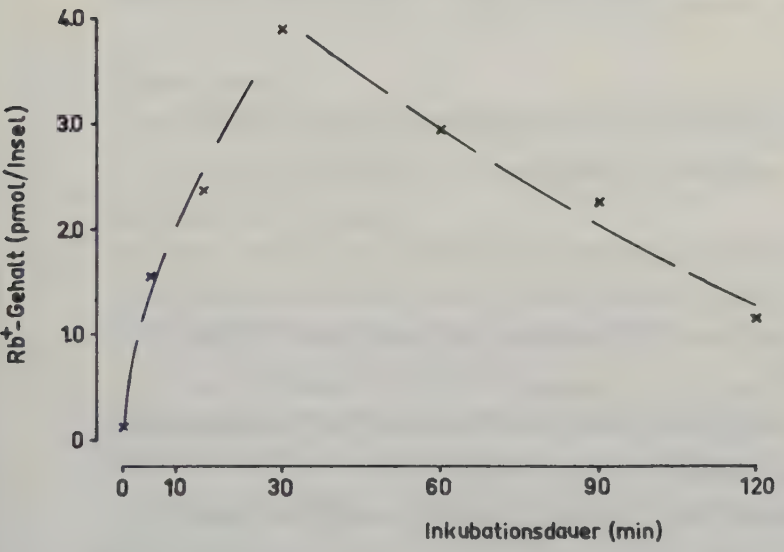


Abb. 11: Rubidiumaufnahme in isolierte Langerhanssche Inseln
Inkubation: 20 Inseln in 0,7 ml KRB, Glucose 3 mM, Dextran 6 %, Rb 0,77 mM

Schlußfolgerung:

1. Durch Zusatz von Dextran 6 % zum Hauptinkubationsmedium konnte das Absinken des Gehaltes der Inseln an Rubidium nach einer Inkubationsdauer von mehr als 30 Minuten nicht verhindert werden.

2. Die Erhöhung der Rubidiumkonzentration im Inkubationsmedium

von zuvor ca. 0,2 mM auf nun ca. 0,8 mM hatte zwar eine Erhöhung der von den Inseln aufgenommenen Rubidiummengen zu allen gemessenen Zeitpunkten zur Folge (vgl. 3.3.6), konnte aber das Absinken des Rubidiumgehaltes nach Inkubationszeiten von mehr als 30 Minuten nicht verhindern.

3.3.9 Ersatz des Kaliums in der KRB-Lösung durch äquimolare Mengen an Rubidium

Da Rubidium und Kalium um die Aufnahme in die Insel konkurrieren, wurde versucht, dadurch einen konstanten Gehalt an Rubidium in der Insel auch nach Inkubationszeiten von länger als 30 Minuten zu erreichen, daß das Kalium im Außenmedium gänzlich durch Rubidium ersetzt wurde, somit der Insel nur Rubidiumionen zur Aufnahme angeboten wurden.
Störmöglichkeiten durch Kaliumionen waren hiermit ausgeschalten.
Die Lösung A der KRB-Lösung (2.4.2) wurde folgendermaßen verändert:

NaCl	6,92 g	
RbCl	585,50 mg	(= 416,41 mg Rb)
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	164,26 mg	
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	293,00 mg	
Aqua bidest. ad	100,0	

Der Rubidiumgehalt im Inkubationsmedium betrug 464,193 µg/ml = 5,39 mM.

Ergebnis:

Zeit (min)	15	30	60	90	120
Rb-Gehalt (pmol/Insel)	18,93	17,64	13,78	5,64	2,82

Inkubation: 20 Langerhanssche Inseln in 0,7 ml KRB (modifiziert), Dextran 6 %, Rb 5,39 mM

Schlußfolgerung:

Auch durch den Ausschluß von Kaliumionen als Störfaktoren konnte kein Gleichgewichtszustand für Rubidium in der Langerhansschen Insel erreicht werden.

3.3.10 Inkubation mit KRB, Dextran 6 % und Glucose 16,7 mM

Da bekannt ist, daß Glucose 16,7 mM in der Lage ist, den passiven Rubidiumefflux zu hemmen (Malaisse et al., 1978), wurde ein Versuch unternommen, in dem diese Tatsache dazu ausgenutzt werden sollte, einen konstanten Inselgehalt an Rubidium zu erreichen, da ja ein Influx von Rubidiumionen in die Zelle unter diesen Bedingungen durchaus möglich war, der Efflux aber gleichzeitig gehemmt wurde.

Ergebnis:

Zeit (min)	15	30	60	90	120
Rb-Gehalt (pmol/Insel)	5,02	5,40	2,79	1,35	1,19

Inkubation: 20 Langerhanssche Inseln in 0,7 ml KRB, Glucose 16,7 mM, Dextran 6 %, Rb 0,738 mM

Graphische Darstellung:

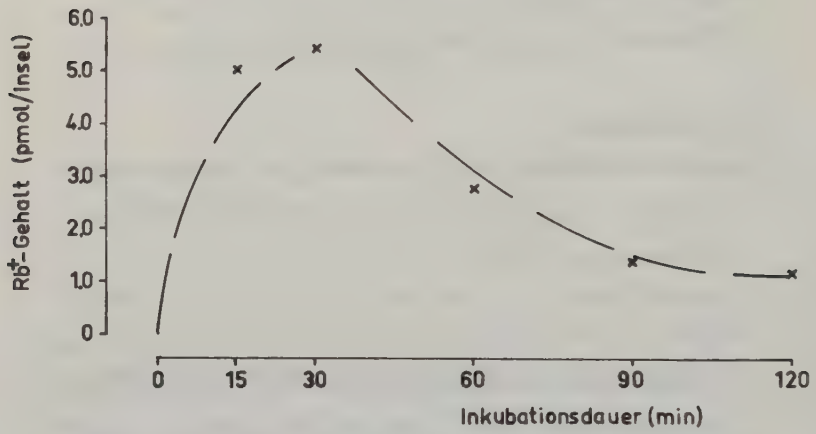


Abb. 12: Rubidiumaufnahme in isolierte Langerhanssche Inseln
Inkubation: 20 Inseln in 0,7 ml KRB, Glucose 16,7 mM, Dextran 6 %, Rb 0,738 mM

Schlußfolgerung:

Auch durch eine Hemmung des Effluxes durch Glucosekonzentrationen von 16,7 mM im Inkubationsmedium konnte kein konstanter Inselgehalt an Rubidium über eine längere Inkubationszeit als 30 Minuten erreicht werden. Es ergab sich wie bei allen bisher unternommenen Aufnahmeversuchen eine Steigerung der Rubidiumaufnahme in die Insel bis zu einer Inkubationszeit von ca. 30 Minuten, danach aber ein Absinken der intrazellulären Rubidiumkonzentration.

3.3.11 Versuche zur Insulinsekretion

Nachdem auch diese Variationen in der Zusammensetzung des Hauptinkubationsmediums (3.3.8, 3.3.9, 3.3.10) keine Lösung des Problems brachten, daß nach Inkubationszeiten von mehr als 30 Minuten der Inselgehalt an aufgenommenem Rubidium absinkt, sollte überprüft werden, ob unter diesen Bedingungen die isolierte Insel überleben, bzw. auf Glucosereiz hin Insulin sezernieren kann (vgl. 3.3.7).

Versuchsaufbau:

wie unter 3.3.7 beschrieben

Ergebnis:

Aus den Werten, dargestellt in Tabelle IV und Abbildung 13, ist ersichtlich, daß

a) isolierte Langerhanssche Inseln durchaus in der Lage sind, 3 Stunden in einem Medium, das Dextran 6 % enthält, zu überleben, um anschließend auf einen Glucosestimulus 16,7 mM hin Insulin zu sezernieren (K).

b) Kalium im Medium durch Rubidium ersetzt werden kann, ohne daß die Insulinsekretion isolierter Langerhansscher Inseln auf Glucosereiz hin beeinträchtigt wäre (L).

Schlußfolgerung:

Zwar können isolierte Langerhanssche Inseln in einem Medium mit

Medium Inkubation 3 Stunden	Medium Inkubation 90 Minuten	Insulinsekretion (µE IRI/ml/5 Inseln) ± SEM	
KRB, Glucose 3 mM Dextran 6 %	KRB, Glucose 16,7 mM RSA 2 %	962,23 ± 61,40 (4)	K
KRB, Glucose 3 mM kaliumfrei RSA 2 %	KRB, Glucose 16,7 mM kaliumfrei RSA 2 %	1120,7 ± 52,31 (5)	L
KRB, Glucose 3 mM kein RSA	KRB, Glucose 16,7 mM RSA 2 %	1086,1 ± 73,28 (5)	M

Tabelle IV: Einfluß verschiedener Medienzusammensetzung auf die Insulinsekretion isolierter Langerhansscher Inseln.
Inkubation: Je 5 Inseln in 0,7 ml
Anzahl der Einzelwerte (n) in Klammern
Mean ± SEM
t-test: KL, KM, LM n.s.

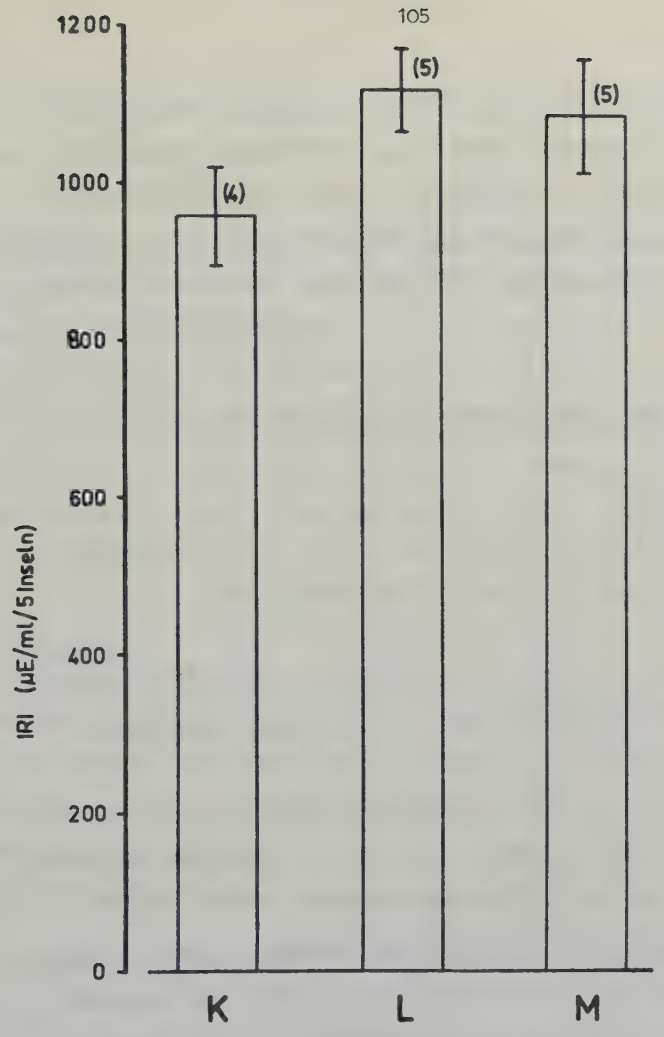


Abb. 13: Einfluß verschiedener Medienzusammensetzung auf die Insulinsekretion isolierter Langerhansscher Inseln.

Inkubation: Je 5 Inseln in 0,7 ml, zunächst in Medium mit Glucose 3 mM, dann Sekretionsphase für 90 Minuten. Medienzusammensetzung Tabelle IV.

Anzahl der Einzelwerte (n) in Klammern

Mean ± SEM

Dextran 6 % über einen Zeitraum von 3 Stunden überleben und danach auf Glucosereiz hin Insulin sezernieren, dennoch sind sie in gleichem Medium nicht in der Lage, einen Gleichgewichtszustand hinsichtlich der Rubidiumaufnahme zu erreichen (3.3.8.2). Es muß wohl zwischen Rubidiumtransport einerseits und Insulinsekretion andererseits durchaus unterschieden werden, was die Sensitivität der beiden Vorgänge hinsichtlich der äußeren Versuchsbedingungen (Zusammensetzung des Mediums) betrifft.

3.3.12 Zur Rolle von Rinderserumalbumin bei der Rubidiumaufnahme in isolierte Langerhanssche Inseln

3.3.12.1 Einfluß der Vorbehandlung der Inseln auf die Rubidiumaufnahme während einer 30-minütigen Hauptinkubation

In allen bisherigen Versuchen hat sich gezeigt, daß sowohl bei Zusatz von 6 % Dextran, bei Erhöhung der Rubidiumkonzentration, bei Ersatz des Kaliums durch inaktives Rubidium, bei Zusatz von Glucose 16,7 mM zum Hauptinkubationsmedium, als auch bei Verwendung von Inkubationsmedium ohne diese Veränderungen - also KRB, Glucose 3 mM - die Insel nach länger als 30 Minuten Inkubationszeit die Fähigkeit zur Speicherung von Rubidium verliert.
War das auf einen Fehler des Hauptinkubationsmediums zurückzuführen, oder ist der Defekt der Insel in der Behandlung vor der Hauptinkubation zu suchen ?

Diese Frage sollte im folgenden geklärt werden:
War es ein Fehler der Zusammensetzung des Hauptinkubationsmediums, dann sollten Inseln jeweils nach 30 Minuten Hauptinkubationszeit den gleichen Gehalt an aufgenommenem Rubidium aufweisen - denn der Defekt trat immer erst nach Inkubationszeiten von länger als 30 Minuten auf.

Lag aber ein Fehler in der Behandlung der Insel vor Beginn der Hauptinkubation vor, dann dürften Inseln - je 30 Minuten lang hauptinkubiert - nicht den gleichen Gehalt an aufgenommenem Rubidium aufweisen.

Versuchsaufbau:

Vorinkubierte und in Gruppen a' 20 Inseln in Reaktionsröhrchen einpipettierte Inseln wurden jeweils 30 Minuten lang hauptinkubiert. Jeweils 3 Inselgruppen wurden gleichzeitig inkubiert, im Abstand von jeweils 20 Minuten wurden weitere Inselgruppen mit 86-Rubidium beladen.

Anschließend wurde der Gehalt an aufgenommenem Rubidium in den Inseln bestimmt.

Während der Wartezeit bis zur Hauptinkubation wurden die Inselgruppen in einem Medium KRB, Glucose 3 mM bei 37°C im Schüttelwasserbad unter Carbogenbegasung aufbewahrt.

Hauptinkubationsmedium: KRB, Glucose 3 mM, 86-Rb 0,74 mM

Aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsreihen ergab sich folgendes Ergebnis:

Aufnahme der sofort hauptinkubierten Inseln 4,729 pmol Rb/Insel = 100 %

nach 20 Minuten Wartezeit	65,72 %
nach 40 Minuten Wartezeit	49,70 %
nach 60 Minuten Wartezeit	33,65 %
nach 80 Minuten Wartezeit	15,30 %

Schlußfolgerung:
Nicht speziell das Hauptinkubationsmedium war die Ursache, die zum Defekt der Inseln führte, sondern entscheidend für die Menge an aufgenommenem Rubidium war die Behandlung der Inseln vor Beginn der Hauptinkubation.

3.3.12.2 Einfluß des pH-Wertes der Medien auf die Rubidiumaufnahme in Langerhanssche Inseln während 30-minütiger Hauptinkubation

Ein Parameter, der in den vorliegenden Versuchen noch nicht genauer überprüft worden war, der aber einen Einfluß auf die Intaktheit der Langerhansschen Inseln haben könnte, war die Konstanz des pH-Wertes der Aufbewahrungs-, Inkubations- und Waschmedien über die gesamte Zeitdauer der Versuche.
Deshalb wurde in einem Versuch direkt vor Versuchsbeginn der pH-Wert der verschiedenen Medien auf den geforderten pH-Wert von 7,35 eingestellt. Nach Beendigung des Versuchs wurde wie-

derum der pH-Wert der Medien überprüft. Hierbei stellte sich heraus, daß bei allen geprüften Medien der pH-Wert bis weit über 8 hinaus (Spitzenwert 8,7) in den alkalischen Bereich verschoben war.

Deshalb wurde in nachfolgenden Versuchen - wie auch von anderen Autoren beschrieben (Berglund, 1981; Idahl et al., 1977) - zur pH-Stabilisierung der verschiedenen Medien 20 mM HEPES zur bicarbonatfreien Krebs-Ringer-Lösung zugesetzt.
D.h. die Krebs-Ringer-Lösung hatte nun folgende Zusammensetzung (vgl. 2.4.2):

Lösung A	10,0
Lösung C	10,0
HEPES	20 mM
Aqua bidest. ad	100,0

Mit diesem neuen Versuchsmedium wurde im folgenden Versuch nachgeprüft, ob der Parameter pH-Wert-Verschiebung während der Inkubations- bzw. Wartezeit den Defekt an den Inseln ausgelöst hatte.

Wie unter 3.3.12.1 beschrieben, wurden Inseln jeweils 30 Minuten lang hauptinkubiert. In diesem Versuch wurden Wartezeiten bis zum Beginn der Hauptinkubation von 40, 75 und 100 Minuten festgesetzt.

Ergebnis:

Wartezeit	0 Minuten	100 %
Wartezeit	40 Minuten	119,2 %
Wartezeit	75 Minuten	62,6 %
Wartezeit	100 Minuten	13,0 %

Der pH-Wert wurde nach Beendigung des Versuchs nachgeprüft. Er war konstant bei pH 7,35. Der Unterschied aber zu den anderen Versuchen war, daß während der Wartezeit und während der Hauptinkubation nicht mit Carbogen begast wurde, sondern - wie auch von den oben genannten Autoren durchgeführt - die Inseln nicht besonders begast wurden.

Schlußfolgerung:

Der pH-Wert konnte unter diesen genannten Versuchsbedingungen über die gesamte Zeitdauer des Versuches konstant gehalten werden; dieser Parameter konnte aber wohl nicht dafür verantwortlich gemacht werden, daß die Inseln nach entsprechender Zeitdauer nur noch einen Bruchteil dessen an Rubidium aufnehmen konnten, was zu Beginn des Versuches (bei sofortiger Hauptinkubation) von den Inseln aufgenommen wurde.

Im selben Versuch wurde - unter diesen neuen Bedingungen - versucht, eine Aufnahmekurve zu erstellen.

Ergebnis:

Zeit (min)	30	60	90	120
Rb-Gehalt (pmol/Insel)	0,54	0,20	0,46	0,26

Inkubation: 20 Langerhanssche Inseln in 0,7 ml Krebs-Ringer-Lösung, HEPES 20 mM, Glucose 3 mM, Dextran 6 %, 86-Rb 0,2 mM

Schlußfolgerung:

Durch eine Konstanz des pH-Wertes während der gesamten Inkubationsdauer konnte das Absinken der Rubidiumkonzentration in der Insel nach Inkubationszeiten von mehr als 30 Minuten nicht verhindert werden.

3.3.12.3 Versuche mit RSA 5 ‰ im Medium

a) Um die Rolle von RSA für die Rubidiumaufnahme zu klären, wurden Versuche angeschlossen, die denen unter 3.3.12.1 und 3.3.12.2 im Aufbau entsprachen.

Hierzu wurde zunächst das Hauptinkubationsmedium beibehalten, nur das Aufbewahrungsmedium wurde dahingehend verändert, daß RSA in einer Konzentration von 5 ‰ zugesetzt wurde.
Zunächst einmal so überprüft, daß nur wieder Inkubationen mit 30 Minuten Dauer durchgeführt wurden (Hauptinkubationsmedium ohne RSA):

Ergebnis:

Wartezeit (min)	0	35	60
Rb-Gehalt (pmol/Insel)	0,621	0,454	0,681

Inkubation: 20 Langerhanssche Inseln in 0,7 ml Krebs-Ringer-Lösung, HEPES 20 mM, Glucose 3 mM, 86-Rb 0,2 mM
Inkubationszeit: t = 30 min
Aufbewahrungsmedium mit RSA 5 ‰

Schlußfolgerung:

Es konnte erstmals kein so deutliches Absinken der aufgenommenen Menge an Rubidium, wie dies in vorausgegangenen Versuchen der Fall war, auch bei einer Wartezeit von 60 Minuten festgestellt werden.

b) Auch wurde im gleichen Versuch eine Aufnahmekurve erstellt, bei der zum Hauptinkubationsmedium RSA 5 ‰ zugesetzt worden war.

Ergebnis:

Zeit (min)	30	60	90	120
Rb-Gehalt (pmol/Insel)	0,848	0,789	1,088	0,799

Inkubation: 20 Langerhanssche Inseln in 0,7 ml Krebs-Ringer-Lösung, HEPES 20 mM, Glucose 3 mM, RSA 5 ‰, 86-Rb 0,2 mM

Schlußfolgerung:

Aus diesen beiden Teilversuchen konnte deutlich gegenüber den zuvor durchgeführten Versuchen ein Unterschied dahingehend festgestellt werden, daß bei Zusatz von RSA 5 ‰ zu den Medien

a) die Insel auch nach längerer Aufbewahrungszeit (60 Minuten) in der Lage war, genauso viel Rubidium aufzunehmen wie dies bei sofortiger Hauptinkubation der Fall war.

b) ein Absinken des Rubidiumgehaltes in der Insel bei Inkubationszeiten von länger als 30 Minuten nicht mehr beobachtet werden konnte.

RSA scheint also für die Aufnahme von Rubidiumionen in die Zelle und für eine Aufrechterhaltung eines einmal erreichten Gleichgewichtszustandes eine Rolle zu spielen.

3.3.13 Erstellen einer Aufnahmekurve für Rubidium in isolierte Langerhanssche Inseln mit RSA 5 ‰ im Hauptinkubationsmedium

Nachdem in Vorversuchen (3.3.12.3) gezeigt worden war, daß mit Krebs-Ringer-Lösung, die Glucose 3 mM, HEPES 20 mM und RSA 5 ‰ als Zusätze enthielt, zugesetztes Rubidium in die Zelle aufgenommen wurde und sich auch ein Gleichgewichtszustand herstellen und erhalten ließ, wurde nun im folgenden eine Versuchsreihe durchgeführt, die zum Ziel eine statistisch auswertbare Aufnahmekurve für Rubidium in isolierte Langerhanssche Inseln hatte.

Hauptinkubationsmedium:

Krebs-Ringer-Lösung (bicarbonatfrei), HEPES 20 mM,
Glucose 3 mM, RSA 5 ‰, 86-Rb 0,19 mM

Es wurde keine Carbogenbegasung durchgeführt.

Schlußfolgerung:

Aus Tabelle V und Abbildung 14 kann entnommen werden, daß die Insel nun unter diesen Versuchsbedingungen in der Lage war, einen bei ca. 30 Minuten erreichten Gleichgewichtszustand auch bis zu einer Inkubationsdauer von 120 Minuten aufrechtzuerhalten.

Das bei den ersten Versuchen aufgetretene Problem des zu hohen und zu unterschiedlichen Backgrounds der Netze konnte befriedigend gelöst werden (vgl. 3.3.1, 3.3.2).

In den hier ausgewerteten Versuchen lag der Background, der durch das Netz verursacht wurde, bei durchschnittlich 4,37 % der Werte, die bei den Inselgruppen (Inkubationszeit 90 Minuten) gemessen wurden.

Auch traten innerhalb eines Versuches keine so starken Streuungen mehr auf, wie unter 3.3.2 beschrieben.

Dieser Background kann im Rahmen der Genauigkeit der Bestimmung noch toleriert werden.

Die Verbesserung wurde auf eine bessere und noch schnellere Handhabung der Netzgefäße bei dem Waschvorgang zurückgeführt.

Mit diesem Versuchsaufbau war nun die Grundlage für eine Betrachtung des 86-Rubidiumeffluxes erarbeitet worden.

Tabelle V : Aufnahme von 86-Rubidium in isolierte Langerhanssche Inseln

Zeit (min)	86-Rubidiumaufnahme (pmol/Insel) ± SEM		
0	0,068 ± 0,008	(7)	A
5	0,636 ± 0,216	(6)	B
15	0,993 ± 0,165	(7)	C
30	1,232 ± 0,223	(8)	D
60	1,510 ± 0,278	(8)	E
90	1,420 ± 0,222	(7)	F
120	1,430 ± 0,200	(6)	G

Inkubation: 20 Langerhanssche Inseln in 0,7 ml Krebs-Ringer-Lösung (bicarbonatfrei), Glucose 3 mM, HEPES 20 mM, RSA 5 %, 86-Rubidium 0,196 mM.

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mean ± SEM

t-test : AG: $p < 0.001$

BG: $p < 0.05$

CG: $p < 0.2$

DG, EG, FG n.s.

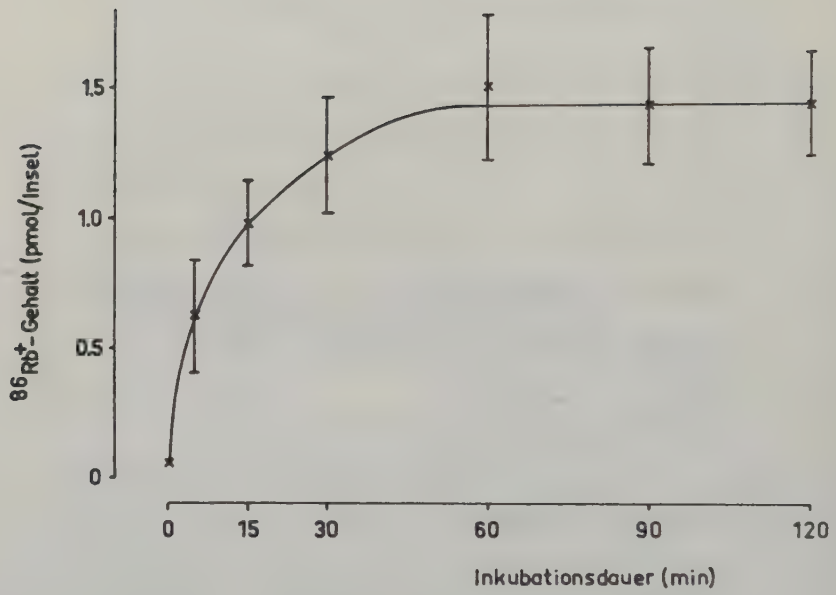


Abb. 14: ^{86}Rubidiumaufnahme in isolierte Langerhanssche Inseln.

Inkubation: 20 Inseln in 0,7 ml Krebs-Ringer-Lösung (bicarbonatfrei), HEPES 20 mM, Glucose 3 mM, RSA 5 %, ^{86}Rb 0,19 mM

Anzahl der Einzelwerte (n) in Klammern

Mean ± SEM

t-test

3.3.14 Versuche zur Insulinsekretion

Nachdem nun ein steady-state-Gleichgewicht für die Rubidiumaufnahme in Langerhanssche Inseln erreicht werden konnte, sollte nun wiederum (vgl. 3.3.7 und 3.3.11) überprüft werden, ob unter den nun gefundenen und verwendeten Versuchsbedingungen zur Rubidiumaufnahme isolierte Langerhanssche Inseln auch in der Lage sind, auf Glucosereiz hin Insulin zu sezernieren.

Versuchsaufbau:

Vorinkubierte Langerhanssche Inseln (3.2.2) wurden jeweils in Gruppen a' 5 Inseln in ein Reaktionsröhrchen einpipettiert und 3 Stunden lang in verschiedenen Medien (Tabelle VI) inkubiert. Nach diesen 3 Stunden wurden die Reaktionsröhrchen aus den Inkubationsgefäßen entfernt, Mediumsreste abgesogen und die Reaktionsröhrchen nun in ein zweites Inkubationsgefäß gestellt. Diese erneute Inkubation dauerte 90 Minuten. Nach dieser Zeit wurden die Reaktionsröhrchen wieder aus dem Medium entfernt, sowie ein Aliquot (0,1 ml) der Inkubationslösungen nach kurzem Schütteln aus den jeweiligen Inkubationsgefäßen entnommen; in diesem Anteil wurde der Insulingehalt bestimmt.
Sämtliche Inkubationen wurden bei 37°C im Schüttelwasserbad durchgeführt, das Inkubationsvolumen betrug in jedem Fall 0,7 ml.

Ergebnis:

Wie in Abbildung 15 und Tabelle VI dargestellt, können

a) Langerhanssche Inseln in einem Medium Krebs-Ringer-Lösung,

Medium Inkubation 3 Stunden	Medium Inkubation 90 Minuten	Insulinsekretion (µE IRI/ml/5 Inseln) ± SEM		
KRB, Glucose 3 mM RSA 5 ‰	KRB, Glucose 3 mM RSA 5 ‰	168,33 ± 16,95	(6)	N
KRB, Glucose 3 mM RSA 5 ‰	KRB, Glucose 16,7 mM RSA 5 ‰	1018,55 ± 144,49	(8)	O
Krebs-Ringer-Lösung, HEPES 20 mM Glucose 3 mM RSA 5 ‰	Krebs-Ringer-Lösung, HEPES 20 mM Glucose 16,7 mM RSA 5 ‰	179,96 ± 29,63	(6)	P
Krebs-Ringer-Lösung, HEPES 20 mM Glucose 3 mM RSA 5 ‰	Krebs-Ringer-Lösung, HEPES 20 mM Glucose 16,7 mM RSA 5 ‰	829,26 ± 95,32	(6)	Q

Tabelle VI: Einfluß von HEPES 20 mM und Carbogenbegasung auf die Insulinsekretion isolierter Langerhansscher Inseln.
Inkubation: Jeweils 5 Inseln in 0,7 ml
Anzahl der Einzelwerte (n) in Klammern
Mean ± SEM t-test: NO, PQ $p < 0.001$
NP, OQ n.s.

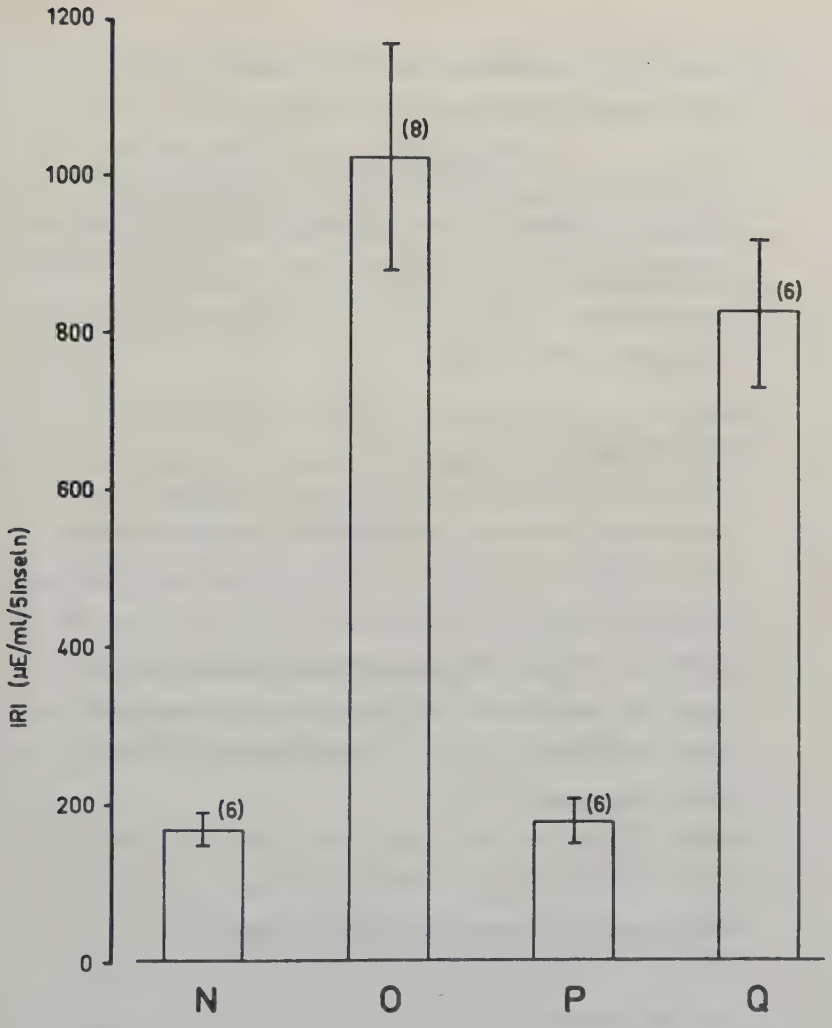


Abb. 15: Einfluß von HEPES 20 mM und Carbogenbegasung auf die Insulinsekretion isolierter Langerhansscher Inseln.
Inkubation: Je 5 Inseln in 0,7 ml zunächst in Medium mit Glucose 3 mM für 3 Stunden, dann Sekretionsphase für 90 Minuten in Medium mit Glucose 16,7 mM (siehe Tab. VI)
Anzahl der Einzelwerte (n) in Klammern
Mean ± SEM, t-test

HEPES 20 mM, Glucose 3 mM, RSA 5 ‰ 3 Stunden bei 37°C im Schüttelwasserbad überleben.

b) Langerhanssche Inseln in einem Medium Krebs-Ringer-Lösung, HEPES 20 mM, Glucose 16,7 mM, RSA 5 ‰ Insulin sezernieren. Die sezernierte Menge Insulin unterscheidet sich nicht signifikant von derjenigen, die mit einem Medium KRB, Glucose 16,7 mM, RSA 5 ‰ erzielt wurde (O, Q).

Schlußfolgerung:

Es konnte gezeigt werden, daß das verwendete Medium keinen nachteiligen Einfluß auf die Physiologie der Langerhansschen Insel (Parameter Insulinsekretion) hat. Gleichzeitig konnte damit gezeigt werden, daß eine Begasung mit Carbogen außer zum Zwecke der Pufferung (zusammen mit Bicarbonationen der KRB-Lösung) keine Bedeutung für die Funktionsfähigkeit der Inseln besitzt (HEPES-Proben wurden auf Grund des geänderten Puffersystems nicht begast).

3.4 Versuche zur Messung des Rubidiumeffluxes

Ziel der Versuche war es, einen Versuchsaufbau zu entwickeln, mit dem es möglich war, den Rubidiumefflux aus zuvor mit Rubidium beladenen (3.3) Inseln zu bestimmen.
Prinzipiell sind 2 verschiedene Möglichkeiten denkbar, um eine Aussage über den Rubidiumefflux zu erhalten:

1. die Bestimmung des 86-Rb, das während der Effluxzeit von den Langerhansschen Inseln an das Medium abgegeben wird, aus dem Effluxmedium heraus (= Außenmethode).
2. die Bestimmung des 86-Rb, das nach der Effluxzeit noch in den Langerhansschen Inseln enthalten ist. Diese Methode wurde unter anderem von Sehlin und Täljedal, 1974 beschrieben (= Innenmethode).

Im Rahmen dieser Arbeit, die die Erstellung einer Methode des 86-Rubidiumeffluxes aus Langerhansschen Inseln zum Ziel hatte, wurden beide Verfahren vergleichend untersucht.

3.4.1 Bestimmung des Rubidiums im Effluxmedium (= Außenmethode)

3.4.1.1 Ausgangssituation

Da es zunächst um verfahrenstechnische Probleme ging und die prinzipielle Gangbarkeit der Methode festgestellt werden sollte, wurde eine Hauptinkubationszeit von t = 30 Minuten (gegenüber sonstigen Versuchen t = 90 Minuten) gewählt.

Versuchsaufbau:

Gruppen a' 20 Inseln wurden 30 Minuten lang einer Hauptinkubation (3.2.3) unterzogen und anschließend 2 mal gewaschen (3.2.4); danach wurden die Reaktionsröhrchen in Inkubationsgefäße gestellt, in die zuvor 0,7 ml des Effluxmediums einpi-

pettiert worden waren.

Nach 10 Minuten erneuter Inkubation, die ebenso im Schüttelwasserbad bei 37°C durchgeführt wurde, entfernte man die Reaktionsröhrchen aus den Inkubationsgefäßen und entnahm vom Effluxmedium jeweils 100, 200 und 300 µl.

Im gleichen Versuch wurde zur Kontrolle bei verschiedenen Inselgruppen der Rubidiumgehalt nach 30 Minuten Hauptinkubationszeit gemessen.

Ergebnis:

Aufnahmewerte 30 min	I	II	III
cpm	2062	2681	2463

Inkubation: 20 Langerhanssche Inseln in 0,7 ml Krebs-Ringer-Lösung, HEPES 20 mM, Glucose 3 mM, RSA 5 %, 86-Rb 0,2 mM
Werte in cpm/Inselgruppe

Effluxwerte (10 min), 30 Minuten Hauptinkubation und anschließende 10-minütige Effluxinkubation:

Menge entnommenes Effluxmedium	I	II	III	IV	V
100 µl	8789	7173	7813	7016	15214
200 µl	16416	14637	14783	13809	27578
300 µl	24969	21207	20955	20453	43590

Die Werte sind in cpm angegeben.

Die cpm-Werte, die bei Messung des Effluxmediums erhalten wurden, lagen um ein Vielfaches (selbst bei Entnahme von nur 0,1 ml des Gesamteffluxmediums von 0,7 ml) höher, als die cpm-Werte, die im gleichen Versuch bei "Aufnahmeinselgruppen" gemessen wurden.

Schlußfolgerung:

Trotz Waschung hatte das Reaktionsröhrchen und das Netz während der Hauptinkubation so viel Radioaktivität gebunden und diese nun wieder an das Effluxmedium abgegeben, daß eine Bestimmung des von den Langerhansschen Inseln abgegebenen Rubidiums nicht möglich war.

Daß die Hauptmenge 86-Rb an das Reaktionsröhrchen gebunden wurde, konnte durch einen Versuch, in dem Styrolrohre ohne Netz 30 Minuten lang einer Hauptinkubation (3.2.3) unterzogen wurden, bestätigt werden. Nach 2-maliger Waschung wurden die cpm-Werte für diese Styrolrohre ermittelt:

Styrolrohr	I	II	III
cpm	41789	27795	74952

Je 1 Styrolrohr ohne Netz in 0,7 ml Krebs-Ringer-Lösung, HEPES 20 mM, Glucose 3 mM, RSA 5 %, 86-Rb 0,2 mM
Werte in cpm/Styrolrohr

In diesem Versuch wurden für Inselgruppen a' 20 Inseln nach 30 Minuten Hauptinkubation durchschnittliche Countzahlen von

$$1116{,}3 \pm 101{,}3 \text{ cpm/20 Inseln} \quad (n = 10)$$

ermittelt.

3.4.1.2 Messung des Rubidiumeffluxes aus Langerhansschen Inseln nur mit Nylonnetz

Da die vom Reaktionsröhrchen selbst gebundene und an das Effluxmedium wieder abgegebene Radioaktivitätsmenge eine Bestimmung des Rubidiumeffluxes aus den Langerhansschen Inseln unmöglich machte (3.4.1), wurden in einem weiteren Versuch Inselgruppen a' 20 Inseln 30 Minuten lang hauptinkubiert, 2 mal gewaschen, sodann mit einer Pinzette das Netz vom Reaktionsröhrchen entfernt und in ein Inkubationsgefäß, in dem sich 0,7 ml Effluxmedium befanden, gegeben; nach 10 Minuten Inkubationszeit bei 37°C im Schüttelwasserbad wurde wie im vorstehenden Versuch (3.4.1) ein Aliquot (200 µl) des Effluxmediums (0,7 ml) entnommen.

Ergebnis:

Durchschnittscountzahl Aufnahmeinseln (30 Minuten)

1116,3 ± 101,3 cpm/20 Inseln (n = 10)

Das entspricht einem durchschnittlichen Gehalt von 2,168 pmol 86-Rb/Insel.

Durchschnittscountzahl Effluxmedium (200 µl)

a) Effluxmedium mit Glucose 3 mM

1003,5 ± 182,2 cpm (n = 4)

Umgerechnet auf 0,7 ml Gesamteffluxmedium entspricht dies durchschnittlich 3512,25 cpm; dies entspräche einem Rubidiumgehalt von 38,97 pmol.

b) Effluxmedium Glucose 16,7 mM

534,0 ± 48,95 cpm (n = 3)

Umgerechnet auf 0,7 ml Gesamteffluxmedium entspricht dies durchschnittlich 1869 cpm; dies entspräche einem Rubidiumgehalt von 20,65 pmol.

Auch bei dieser Versuchsanordnung zeigte sich, daß nach Multiplikation der erhaltenen cpm-Werte der Effluxmedienaliquote mit dem Faktor 3,5 (da 200 µl von 700 µl Medium entnommen wurden) man cpm-Werte erhielt, die weitaus über denen lagen, die bei denjenigen Inselgruppen gemessen wurden, die 30 Minuten lang hauptinkubiert wurden.

Schlußfolgerung:

Da Kontaminationen (der Reaktionsgefäße und auch der Inkubationsröhrchen) ausgeschlossen werden konnten, waren 2 Möglichkeiten denkbar, die zu diesem Ergebnis geführt hatten:

1. Die Netze an sich binden während der Hauptinkubation (= Beladung mit 86-Rb) sehr viel und uneinheitlich 86-Rb und geben dies - trotz 2-maliger Waschung nach der Hauptinkubation - während der 10-minütigen Effluxinkubation an das Medium ab.

2. Es liegt ein systematischer Fehler vor, d.h. eine Messung von 86-Rb in den Langerhansschen Inseln entspricht nicht der Messung von 86-Rb in Lösung. Oder anders: Hyamin als Gewebelöser ist ungeeignet oder verfälscht bzw. vermindert während der Messung den tatsächlichen 86-Rubidiumgehalt in der Insel durch Quencheffekte.

3.4.1.3 Bestimmung des 86-Rubidiumeffluxes mit Leernetzen

Leere Reaktionsgefäße (ohne Langerhanssche Inseln) wurden 30 Minuten lang hauptinkubiert, 2 mal gewaschen und sodann das Netz mit einer Pinzette abgezogen und in Inkubationsgefäße übergeführt, in die zuvor 0,7 ml Effluxmedium einpipettiert worden waren. Nach erneuter Inkubation (10 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad) wurden 0,5 ml des Mediums entnommen, mit Unisolve I versetzt und im ß-Counter gemessen.

Ergebnis:

Aus mehreren Versuchen ergab sich, daß durchschnittlich

$$2{,}979 \pm 0{,}371 \text{ pmol } ^{86}\text{Rb/Netz } (n = 7)$$

in 0,7 ml Effluxmedium abgegeben wurde.

Da in gleichen Versuchen mit Langerhansschen Inseln durchschnittlich pro Insel

$$3{,}488 \pm 0{,}753 \text{ pmol } ^{86}\text{Rb/Insel } (n = 9)$$

in 0,7 ml Effluxmedium abgegeben wurde, fällt der Anteil 86-Rb, der vom Netz an das Effluxmedium abgegeben wurde (< 5 % bei Inselgruppen a' 20 Inseln) nicht so ins Gewicht, daß er für die Nichtgangbarkeit der Messung verantwortlich gemacht werden konnte.

Schlußfolgerung:

Es mußte davon ausgegangen werden, daß die zweite der oben angegebenen Möglichkeiten zutraf, daß der Fehler der Methode in der Wahl des Gewebelösers Hyaminhydroxid zu suchen war.

3.4.1.4 Vergleich zwischen Hyaminhydroxid und Gewebelöser Riedel-de Haen

Es sollte untersucht werden, ob durch Verwendung eines anderen Gewebelösers gegenüber dem bisher verwendeten Hyaminhydroxid eine Veränderung, d.h. eine Erhöhung der bisher an Inselgruppen gemessenen Countzahlen und damit rechnerisch ein höherer Gehalt an aufgenommenem 86-Rb, erreicht werden konnte.
Hierzu wurden Inselgruppen a' 20 Inseln 90 Minuten lang hauptinkubiert, 2 mal gewaschen, und, nachdem das Netz mit einer Pinzette abgezogen worden war, entweder mit 20 µl Hyaminhydroxid oder 20 µl Gewebelöser Riedel-de Haen versetzt, Unisolve I zugegeben, vom Netz abdekantiert und sodann der 86-Rubidiumgehalt der Proben durch Messung im ß-Counter festgestellt.

Ergebnis:

Es ergab sich für die Gruppen mit Hyaminhydroxid ein durchschnittlicher 86-Rubidiumgehalt von

$$1{,}451 \pm 0{,}216 \text{ pmol 86-Rb/Insel } (n = 7),$$

für die Gruppen, die mit Gewebelöser Riedel-de Haen versetzt wurden, ein durchschnittlicher Gehalt von

$$5{,}529 \pm 1{,}067 \text{ pmol 86-Rb/Insel } (n = 7).$$

Diese beiden Werte unterscheiden sich signifikant ($p < 0.01$, t-test) voneinander.

Schlußfolgerung:

Durch Verwendung eines anderen Gewebelösers konnte die Zählausbeute des 86-Rb in der Langerhansschen Insel signifikant gesteigert werden. D.h., es ist durchaus denkbar, daß die Ergebnisse, wie sie unter 3.4.2 gefunden wurden, auf die Verwendung von Hyamin und dessen Quencheffekt zurückzuführen waren.

3.4.1.5 Messung des Rubidiumeffluxes aus Langerhansschen Inseln

Es sollte nun festgestellt werden, ob die Effluxmessung dann verwertbare Daten liefert, wenn die in Vergleich dazu gestellten Aufnahmeinselgruppen anstatt mit Hyamin mit Gewebelöser Riedel-de Haen behandelt werden.
Dazu wurde der Versuch, wie unter 3.4.2 beschrieben, wiederholt mit der Änderung

a) hinsichtlich des Gewebelösers
b) daß zunächst nur eine Glucosekonzentration von 3 mM im Effluxmedium verwendet wurde, da hier gegenüber der Glucosekonzentration von 16,7 mM der größere Anteil von 86-Rb im Effluxmedium zu erwarten ist, da höhere Glucosekonzentrationen (z.B. 16,7 mM) den 86-Rubidiumefflux hemmen.

Ergebnis:

Aufnahmeinseln 90 Minuten:

$5{,}529 \pm 1{,}152$ pmol 86-Rb/Insel ($n = 7$)

Effluxwerte, pro Insel an das Medium während 10 Minuten abgegeben:

3,488 ± 0,753 pmol 86-Rb/Insel (n = 9)

Das entspricht einem durchschnittlichen Verlust von 58,5 % des ursprünglichen Gehaltes von 86-Rb in der Insel.

Schlußfolgerung:

Durch Verwendung des Gewebelösers Riedel-de Haen konnte erreicht werden, daß generell eine Bestimmung des ausfließenden 86-Rb während einer Effluxzeit von 10 Minuten möglich war.

3.4.1.6 Messung des 86-Rubidiumeffluxes aus Langerhansschen Inseln mit der Außenmethode. Untersuchung von Glucose 3 mM und Glucose 16,7 mM

In einem weiterführenden Versuch sollte nun geklärt werden, ob mit der jetzt generell als gangbar erachteten Außenmethode (3.4.1.5) eine Hemmwirkung einer hohen Glucosekonzentration (16,7 mM) gegenüber einer niedrigen Glucosekonzentration (3 mM) auf den Rubidiumefflux festgestellt werden kann.
Hierzu wurden Inselgruppen a' 20 Inseln jeweils 90 Minuten lang hauptinkubiert und 2 mal gewaschen. Sodann wurde mit einer Pinzette das Netz abgezogen und in ein Inkubationsgefäß übergeführt, in das zuvor 0,7 ml des entsprechenden Effluxmediums einpipettiert worden waren. Nach erneuter Inkubation (10 min) bei 37°C im Schüttelwasserbad wurden jeweils 0,65 ml des Effluxmediums entnommen, mit Unisolve I versetzt und im ß-Counter der 86-Rubidiumgehalt der Proben bestimmt.

Ergebnis:

Effluxmedium KRB, RSA 5 ‰ Glucose 3 mM	Effluxmedium KRB, RSA 5 ‰ Glucose 16,7 mM
4,652 ± 0,773 (n = 9)	4,315 ± 0,526 (n = 9)
pmol 86-Rb/Insel an 0,7 ml Medium abgegeben	

Zwischen den Ergebnissen beider Versuchsgruppen läßt sich kein signifikanter Unterschied feststellen.

Schlußfolgerung:

Mit dieser - so durchgeführten - Außenmessungsmethode läßt sich eine Rubidiumeffluxmessung nicht sensibel genug durchführen, um Unterschiede zwischen - z.B. verschiedenen Glucosekonzentrationen - sichtbar werden zu lassen.

3.4.2 Bestimmung des 86-Rubidiumeffluxes aus Langerhansschen Inseln mit der Innenmethode. Untersuchung von Glucose 3 mM und Glucose 16,7 mM

Nachdem sich mit der Außenmethode (3.4.1.6) kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den 86-Rubidiumefflux zwischen 3 mM und 16,7 mM ergeben hatte, sollte nun mit der Innenmethode (= Inselrestmethode) geprüft werden, ob hier ein Hemmeffekt von 16,7 mM Glucose gegenüber 3 mM Glucose bei Betrachtung des Rubidiumeffluxes sichtbar wird.

Hierzu wurden Inselgruppen a' 20 Inseln jeweils 90 Minuten lang

hauptinkubiert, 2 mal gewaschen und sodann die Reaktionsröhrchen in Inkubationsgefäße gestellt, in die zuvor 0,7 ml des entsprechenden Effluxmediums einpipettiert worden waren. Nach 10-minütiger erneuter Inkubation bei 37°C im Schüttelwasserbad wurden die Reaktionsröhrchen aus den Inkubationsgefäßen entnommen, überstehendes Medium abgesogen und sodann mit einer Pinzette das Netz (mit den Langerhansschen Inseln) vom Styrolrohr abgezogen. Nach Zupipettieren von je 20 µl Gewebelöser Riedel-de Haen, Versetzen der Proben mit Unisolve I, wurde nach einiger Zeit (ca. 10 Minuten) vom Netz abdekantiert. Anschließend wurde der 86-Rubidiumgehalt im ß-Counter bestimmt.

Ergebnis:

Effluxmedium KRB, RSA 5 % Glucose 3 mM	Effluxmedium KRB, RSA 5 % Glucose 16,7 mM
1,889 ± 0,187 (n = 10)	1,998 ± 0,228 (n = 11)
pmol 86-Rb/Insel nach der Effluxinkubation zurückgehalten	

Auch mit der Methode der Innenmessung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Glucose 3 mM und Glucose 16,7 mM hinsichtlich des 86-Rubidiumeffluxes erzielt werden.

Schlußfolgerung:

Da nach dieser Methode der Inselrestmessung Sehlin und Täljedal, 1975 bei Verwendung von Glucose 3 mM und Glucose 20 mM einen Unterschied im 86-Rubidiumgehalt Langerhansscher Inseln der beiden Gruppen von ca. 20 % nach 10-minütiger Effluxinkubation gefunden hatten, muß davon ausgegangen werden, daß dieser Effekt in unserem System überlagert worden ist. Eine Erklä-

rungsmöglichkeit - was sich auch in den Aufnahmeversuchen bestätigt hat - dafür ist sicherlich die schwankende Aufnahme von 86-Rb in die Langerhansschen Inseln, d.h. jede Inselgruppe hat vor Beginn der Effluxinkubation - bedingt durch unterschiedliche Aufnahme von 86-Rb - eine andere Ausgangsbedingung, einen anderen Gehalt an 86-Rb. Es mußte folglich, um diese Fehlerquelle auszuschalten, ein Verfahren entwickelt werden, das eine Aussage darüber zuläßt,

a) wie groß der Gehalt der Inselgruppe an 86-Rb zu Beginn der Effluxinkubation

und

b) wieviel 86-Rb aus eben dieser Inselgruppe während der Effluxinkubation an das Medium abgegeben worden ist.

3.4.3 Bestimmung des 86-Rubidiumeffluxes aus Langerhansschen Inseln mit einer kombinierten Innen- und Außenmessung. Effekt von Glucose 3 mM und Glucose 16,7 mM

Um gleichzeitig eine Aussage über den Inselgehalt an 86-Rb vor Beginn der Effluxinkubation und das von der Insel während der Effluxinkubation an das Effluxmedium abgegebene 86-Rb gewinnen zu können, wurde folgender Versuchsaufbau erstellt:

Inselgruppen a' 20 Inseln werden je 90 Minuten lang hauptinkubiert und sodann 2 mal gewaschen. Mit einer Pinzette wird das Netz vom Styrolrohr abgezogen und in Inkubationsgefäße - die in diesem Fall aus Minivials bestehen -, in die zuvor 0,7 ml des

entsprechenden Effluxmediums einpipettiert worden waren, übergeführt. Nach 10-minütiger erneuter Inkubation, die bei 37°C im Schüttelwasserbad durchgeführt wurde, wurden 0,65 ml des Effluxmediums abpipettiert und in ein zweites Minivial gegeben (Effluxprobe). Das Netz mit den Langerhansschen Inseln und den verbleibenden 0,05 ml Effluxmedium versetzte man mit 20 µl Gewebelöser Riedel-de Haen (= Inselprobe). Zu beiden Proben wird Unisolve I zupipettiert, die Inselprobe vom Netz abdekantiert und anschließend der 86-Rubidiumgehalt im ß-Counter ermittelt. Pro Inselgruppe werden somit also 2 Proben gewonnen, die gemeinsam Aufschluß über den Inselgehalt vor und auch nach der Effluxinkubation geben können.

Als Vergleichsgröße der beiden Gruppen (3 mM und 16,7 mM Glucose) wurde folgender Parameter festgelegt und für jede Inselgruppe errechnet:

$$Q = \frac{\text{Inselgehalt an 86-Rb nach der Effluxinkubation}}{\text{Inselgehalt an 86-Rb vor der Effluxinkubation}}$$

(jeweils in pmol 86-Rb/Insel ausgedrückt)

Zugrundegelegt wurden die Daten, die aus Inselprobe und Effluxprobe jeder Inselgruppe gewonnen wurden. Dabei wurde berücksichtigt,

a) daß die Effluxprobe nur 0,65 ml des Mediums enthielt anstatt 0,7 ml des Gesamteffluxmediums, und
b) daß die Inselprobe nicht nur die Langerhansschen Inseln enthielt, sondern daß auch noch zusätzlich 0,05 ml Effluxmedium mitbestimmt wurden.

Der 86-Rubidiumgehalt vor dem Efflux errechnet sich aus:

Inselgehalt 86-Rb nach Efflux + das in 0,7 ml Medium abgegebene 86-Rb

Ergebnis:

Effluxmedium KRB, RSA 5 ‰ Glucose 3 mM		Effluxmedium KRB, RSA 5 ‰ Glucose 16,7 mM
0,311 ± 0,045 (n = 3)	Q	0,439 ± 0,081 (n = 3)

Aus diesem Ergebnis läßt sich erkennen, daß diejenigen Inselgruppen, bei denen das Effluxmedium Glucose in einer Konzentration von 16,7 mM enthielt, vergleichsweise mehr 86-Rb zurückhielten (Q = 0,439), als diejenigen Inselgruppen, bei denen das Effluxmedium Glucose in einer Konzentration von 3 mM enthielt (Q = 0,311).

Die beiden Ergebnisse sind allerdings nicht signifikant unterschiedlich ($p < 0.1$, t-test).

Schlußfolgerung:

Mit dieser so verfeinerten Methode - der kombinierten Innen- und Außenmessung - konnte durchaus ein Hemmeffekt von Glucose 16,7 mM gegenüber Glucose 3 mM gezeigt werden. Mit der nun erreichten Sensibilität des Meßsystems konnte ein Ergebnis erzielt werden, das mit Ergebnissen aus der Literatur (Sehlin und Täljedal, 1975) durchaus vergleichbar ist. Denn bei einem 'n' (= Anzahl der Versuche) von jeweils 18 erreichen diese Autoren einen signifikanten Unterschied von $p < 0.025$, t-test, für Glu-

cose 3 bzw. 20 mM. Würde in unserem Modell ebenfalls eine Versuchsreihe mit einem 'n' von jeweils 18 durchgeführt, so kann diese Signifikanz - gleiche Streuung der Werte wie oben vorausgesetzt - ebenfalls erreicht werden.

3.4.4 Betrachtung der Statikmessung

Es hat sich in den vorangehend besprochenen Versuchsreihen gezeigt, daß die Methode der 86-Rubidiumeffluxmessung so weit modifiziert werden konnte, daß eine Aussage über die Beeinflussung des 86-Rubidiumeffluxes aus isolierten Langerhansschen Inseln durch verschiedene Glucosekonzentrationen (3 bzw. 16,7 mM) möglich war. Bei entsprechender Versuchsanzahl kann die in der Literatur beschriebene Exaktheit des Systems erreicht werden, sowie Ergebnisse, wie von Sehlin und Täljedal, 1975 dargelegt, verifiziert werden.

Bisherige Untersuchungen in diesem Arbeitskreis lassen vermuten, daß die Effekte der Substanzen und Parameter, die in diesem Modell geprüft werden sollen, zwischen den beiden 'Maximaleffekten' von Glucose 3 mM und Glucose 20 mM anzusiedeln sind. Es ist außerdem nicht immer möglich, mit diesem statischen System Effekte von Substanzen sichtbar machen zu können. So kommen Idahl et al., 1977 mit einem derartigen Meßsystem zu dem Schluß, daß Alloxan 2 mM keinen Einfluß auf den 86-Rubidiumefflux aus Langerhansschen Inseln hat, jedoch wird dieses Ergebnis von Henquin et al., 1979 mit einer Perifusionsmethode widerlegt.

Es wurde deshalb die nun erarbeitete statische Methode nicht weiterverfolgt und angewandt, sondern eine Perifusionsmethodik in enger Anlehnung an eine von Dr. J.C. Henquin, Brüssel verwendete Meßmethode eingeführt.

3.4.5 Einführung einer Perifusionsmethode

3.4.5.1 Überprüfung des Systems

a) Verminderung der 86-Rubidiumeffluxrate durch Erhöhung der Glucosekonzentration im Medium

Daß durch Erhöhung der Glucosekonzentration im Medium der 86-Rubidiumefflux aus Langerhansschen Inseln gehemmt werden kann, ist von verschiedenen Autoren gezeigt worden (Henquin, Sehlin, Malaisse, Boschero), wobei der maximale Hemmeffekt schon bei einer Glucosekonzentration von ca. 6 - 8 mM gefunden wird. Deshalb wurde zunächst zur Überprüfung des Systems ein Versuch durchgeführt, in dem durch Steigerung der Glucosekonzentration im Medium von 3 mM (Phase 1) auf 5,6 mM (Phase 2) ein Hemmeffekt (der reversibel ist) erzielt werden sollte.

Abbildung 16 zeigt, daß durch Glucose 5,6 mM die 86-Rubidiumeffluxrate sehr schnell vermindert wird. Während Phase 2 (Minute 40 - 70) ist die Effluxrate nahezu konstant, im Gegensatz zu Phasen 1 (Minute 20 - 40) und 3 (Minute 70 - 90), in denen

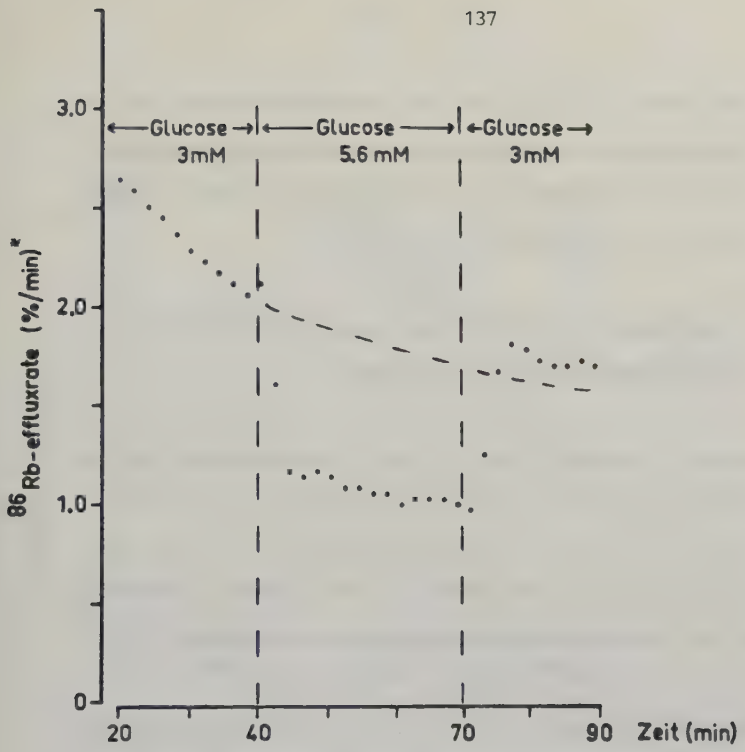


Abb. 16: Verminderung der ^{86}Rubidiumeffluxrate isolierter Langerhansscher Inseln durch Erhöhung der Glucosekonzentration.
Je 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer.
Phasen 1 und 3: KRB, Glucose 3 mM, RSA 5 %.
Phase 2 : KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 %.
----- Vergleichskurve, Phase 2: Glucose 3 mM

* Die Effluxrate gibt an (in %/min), welcher Anteil des sich zu Beginn des Meßintervalles in den Langerhansschen Inseln befindlichen ^{86}Rubidiums während des Meßintervalles im Effluat erscheint.
Die Effluxrate wird berechnet als Quotient aus

$$\frac{^{86}\text{Rb im Effluat (während des Meßintervalls)}}{^{86}\text{Rb zu Beginn des Meßinterv. in den Inseln}} \times \frac{1}{\text{Meßintervall (min)}} \times 100\ \%$$

unter Einwirkung von Glucose 3 mM die 86-Rubidiumeffluxrate mit fortschreitender Perifusionsdauer absinkt. Dieser Hemmeffekt ist reversibel und erreicht rasch den Wert der Vergleichskurve (Glucose 3 mM auch in Phase 2).

b) Vergrößerung der 86-Rubidiumeffluxrate durch Verminderung der Glucosekonzentration im Medium

Es sollte untersucht werden, ob durch Verminderung der Glucosekonzentration von 3 mM auf 0 mM eine Vergrößerung der 86-Rubidiumeffluxrate erzielt werden kann, da bekannt ist, daß schon eine so geringe Glucosekonzentration wie 3 mM eine Hemmwirkung auf die Kaliumpermeabilität ausübt (Henquin, 1980a).

Abbildung 17 zeigt, daß durch Entfernen von Glucose aus dem Medium die 86-Rubidiumeffluxrate schnell gesteigert werden kann (Phase 2). Die Effluxrate sinkt während Phase 2 sehr rasch ab (keine Hemmung des 86-Rubidiumeffluxes). Nach Umschalten auf das Medium mit Glucose 3 mM (Phase 3) erreicht man schnelle Reversibilität des Effektes und eine Stabilisierung der 86-Rubidiumeffluxrate auf einen niedrigeren Wert.

c) Effekt von Tolbutamid 100 µg/ml auf den 86-Rubidiumefflux isolierter Langerhansscher Inseln

Nachdem bereits Henquin, 1982 den Effekt verschiedener Tolbutamidkonzentrationen auf den 86-Rubidiumefflux isolierter Langerhansscher Inseln untersucht hatte, sollte zur weiteren Überprü-

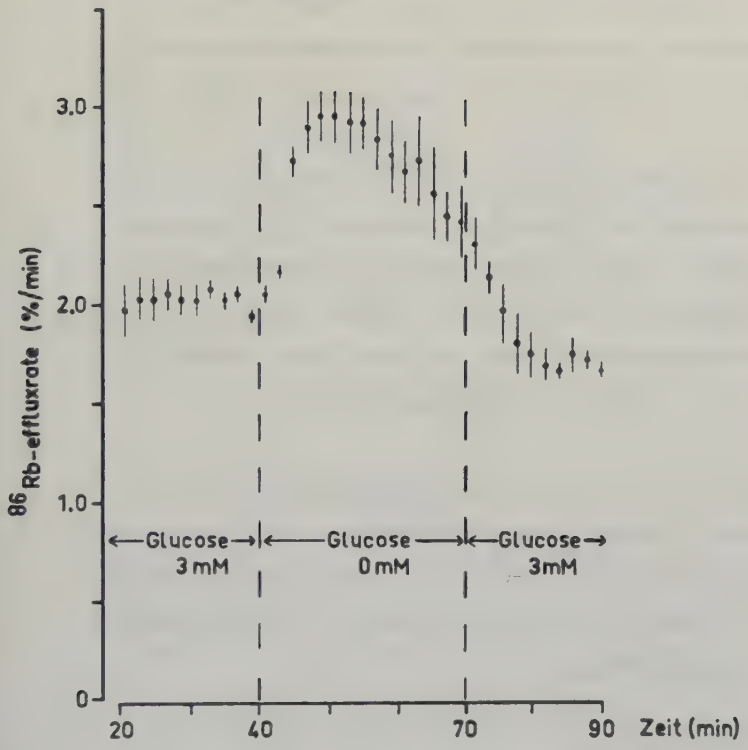


Abb. 17: Vergrößerung der ^{86}Rubidiumeffluxrate isolierter Langerhansscher Inseln durch Verminderung der Glucosekonzentration.
Je 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer.
Phasen 1 und 3: KRB, Glucose 3 mM, RSA 5 ‰
Phase 2 : KRB, Glucose 0 mM, RSA 5 ‰
Mean ± SEM aus 2 Versuchen

fung unseres Systems mit Tolbutamid ein pharmakologischer Hilfsstoff eingesetzt werden, dessen Wirkungsmechanismus von dem des physiologischen Stimulus Glucose unterschiedlich ist.

Aus Abbildung 18 ist ersichtlich, daß Tolbutamid 100 µg/ml in Anwesenheit von Glucose 3 mM sehr schnell die 86-Rubidiumefluxrate vermindert. Dieser Effekt ist ebenso schnell nach Rückschalten auf tolbutamidfreies Medium reversibel, wobei aber im Vergleich zu dem Effekt von Glucose 5,6 mM (Abbildung 16) der sehr große 'Reboundeffekt' auffällt.

Diese 3 erhaltenen Kurven und Werte wurden mit den aus der Literatur bekannten Angaben verglichen; es konnten alle beschriebenen Effekte nachvollzogen werden. Somit konnte davon ausgegangen werden, daß das Perifusionssystem in unseren Händen voll funktionstüchtig ist.

3.4.5.2 Beeinflussung der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Bestimmung der 86-Rubidiumeffluxrate isolierter Langerhansscher Inseln (Perifusion) durch Anwesenheit von exokrinem Gewebe

Bevor mit dieser erarbeiteten Perifusionsmethode verschiedene Parameter in randomisierter Versuchsanlage gemessen wurden, sollte zuvor überprüft werden, ob die Inselqualität - d.h. die subjektiv vom Experimentator ausgewählten Inseln - einen Einfluß auf die Sensitivität und damit die Ergebnisse, die mit

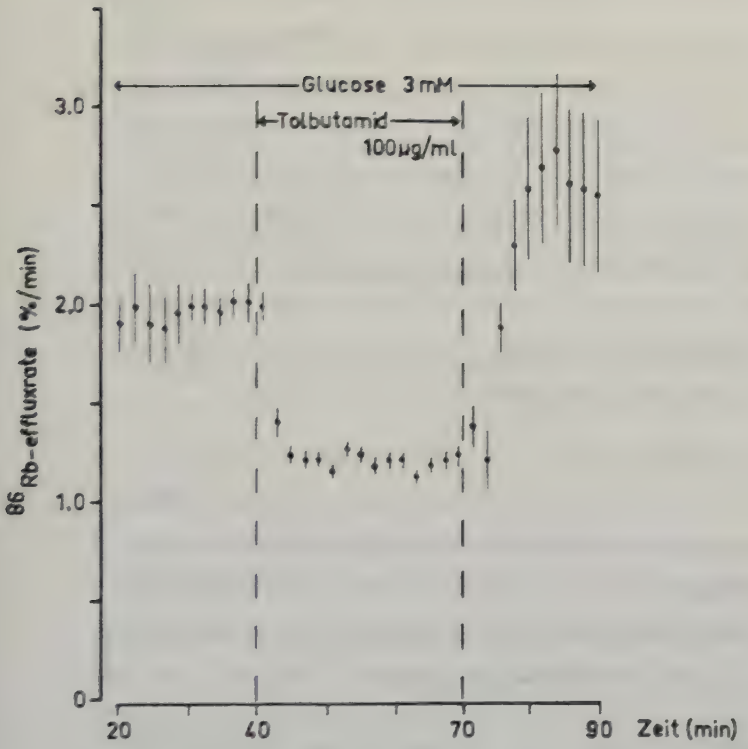


Abb. 18: Einfluß von Tolbutamid 100 µg/ml auf den ^{86}Rubidiumefflux isolierter Langerhansscher Inseln in Gegenwart von Glucose 3 mM.
Phasen 1 und 3: KRB, Glucose 3 mM, RSA 5 %.
Phase 2 : KRB, Glucose 3 mM, RSA 5 %, Tolbutamid 100 µg/ml
Je 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer
Mean ± SEM aus 2 Versuchen

dieser Methode erzielt werden, hat. Nachdem die Perifusionsmethode und die Berechnung der Effluxraten unabhängig von der Zahl der in eine Perifusionskammer eingelesenen Inseln und auch von der Aufnahmefähigkeit (evtl. korrelierbar mit der Größe der Inseln) der einzelnen Langerhansschen Inseln für 86-Rb ist, sollte nun überprüft werden, inwieweit 'Verunreinigungen' isolierter Langerhansscher Inseln durch entweder an den Inseln anhaftenden oder aber sich frei im Medium befindlichen exokrinen Gewebspartikel einen Einfluß auf die mit Hilfe dieser Apparatur erzielten Ergebnisse haben.

Versuchsaufbau:

In diesem Versuch wurden 3 Inselgruppen a' 40 Inseln miteinander verglichen. Zunächst wurden deshalb 120 Inseln ungefähr gleicher Größe so ausgelesen, daß weder exokrines Gewebe mehr an den Langerhansschen Inseln haftete, noch sich exokrine Pankreaspartikel frei im Medium befanden.

Gruppe A: Hier wurden von den aussortierten Langerhansschen Inseln 40 Stück verwendet.

Gruppe B: 40 von den aussortierten Inseln wurden ungefähr im Verhältnis 1:1 mit exokrinem Pankreasgewebe versetzt.

Gruppe C: 40 Langerhanssche Inseln wurden ungefähr im Verhältnis 1:2 mit exokrinem Pankreasgewebe versetzt.

Alle 3 Gruppen wurden nun - wie unter 3.2.9.4 beschrieben - mit 86-Rubidium beladen, anschließend gewaschen und sodann in die Perifusionskammer einsortiert.

Ergebnis:

Aus den Abbildungen 19, 20, 21 ist ersichtlich, daß durch die Anwesenheit von exokrinem Pankreasgewebe Effekte auf den 86-Rubidiumefflux Langerhansscher Inseln, wie z.B. hier durch Erhöhung der Glucosekonzentration von 3 mM (Phase 1) auf 5,6 mM (Phase 2), nahezu überdeckt werden können. Die Verminderung des Effektes ist mit der Menge an anwesendem exokrinen Gewebe korrelierbar.

Die erzielten Effluxratenänderungen, ablesbar am Quotienten der Effluxraten der Fraktionen 19, 20, 21 und 8, 9 und 10 unterscheiden sich deutlich voneinander (A: 0.5243, B: 0.7525, C: 0.900).

Exokrines Pankreasgewebe nimmt während der Beladungsinkubation mit 86-Rb radioaktives Rubidium auf und ist wohl in der Lage, dieses aufgenommene 86-Rb während der Perifusion abzugeben und zwar nicht nach dem Schema der Langerhansschen Inseln, d.h. die Abgabe aus exokrinem Gewebe ist durch eine Erhöhung der Glucosekonzentration von 3 mM auf 5,6 mM nicht beeinflußbar.

Diese kontinuierliche Abgabe von 86-Rb aus exokrinem Gewebe beeinträchtigt bzw. überlagert bei entsprechenden Mengenverhältnissen die Effekte, die an Langerhansschen Inseln erzielt werden können.

Vergleicht man die Quotienten

$$Q = \frac{\text{Gehalt an 86-Rb (Ende Perifusion)}}{\text{Gehalt an 86-Rb (Anfang Perifusion)}} \times 100\ \%$$

so fällt auf, daß dieser Quotient um so kleiner ist, je mehr exokrines Gewebe sich in der Gruppe befand. D.h., daß die Grup-

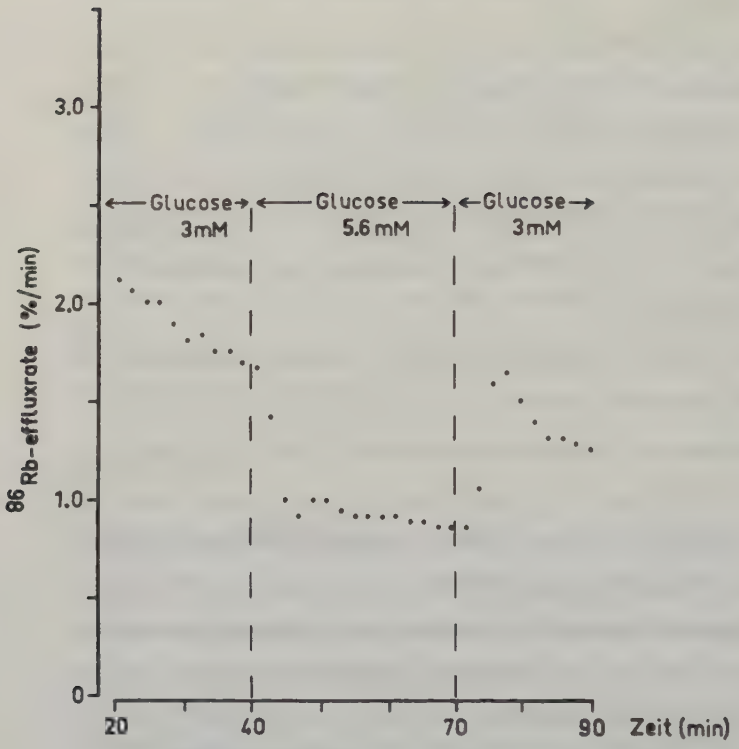


Abb. 19: Verminderung der ^{86}Rubidiumeffluxrate isolierter Langerhansscher Inseln durch Erhöhung der Glucosekonzentration.
Gruppe A: 40 Langerhanssche Inseln
Phase 1 und 3: KRB, Glucose 3 mM, RSA 5 %.
Phase 2 : KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 %.

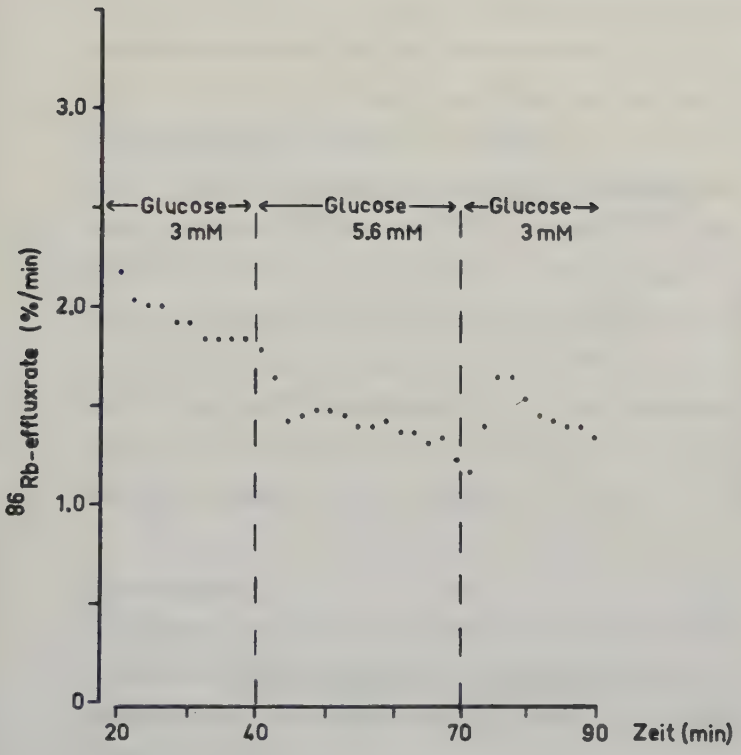


Abb. 20: Verminderung der ^{86}Rubidiumeffluxrate isolierter Langerhansscher Inseln durch Erhöhung der Glucosekonzentration.

Gruppe B: 40 Langerhanssche Inseln + exokrines Pankreasgewebe 1 : 1

Phasen 1 und 3: KRB, Glucose 3 mM, RSA 5 ‰

Phase 2 : KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 ‰

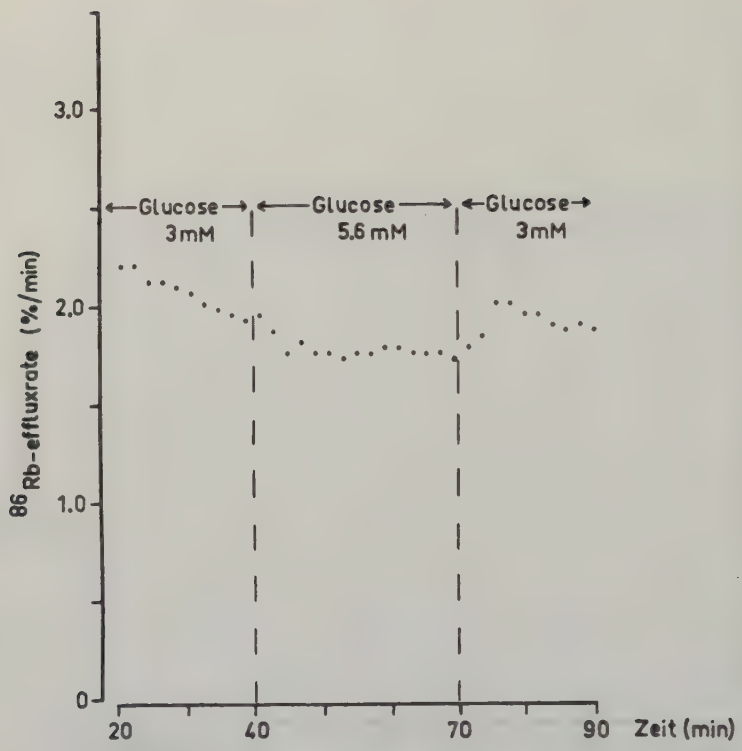


Abb. 21: Verminderung der ^{86}Rubidiumeffluxrate isolierter Langerhansscher Inseln durch Erhöhung der Glucosekonzentration.
Gruppe C: 40 Langerhanssche Inseln + exokrines Pankreasgewebe 1 : 2
Phasen 1 und 3: KRB, Glucose 3 mM, RSA 5 %.
Phase 2 : KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 %.

pen B (31 %) und C (25 %) jeweils relativ mehr ihres Ausgangsrubidiums während der Perifusion verloren hatten, als dies bei Gruppe A (37 %) der Fall war. Dieser Effekt ist auch aus den Abbildungen 19, 20, 21 deutlich zu ersehen, da Gruppe B nur wenig und Gruppe C nahezu gar nicht auf eine Umschaltung der Glucosekonzentration auf 5,6 mM mit einer Verminderung der 86-Rubidiumeffluxrate reagieren, sondern auch während Phase 2 der Perifusion eine deutlich höhere Kaliumpermeabilität aufweisen, als dies bei Gruppe A zu sehen ist.
Auch ist der Gehalt an aufgenommenem 86-Rubidium (gemessen zu Beginn der Perifusion) in Gruppe A deutlich geringer (210710 cpm) als in Gruppen B (364243 cpm) und C (322492 cpm).

Schlußfolgerung:

Es muß darauf geachtet werden, daß sich bei den mit dieser Methode durchgeführten Versuchen kein exokrines Gewebe mehr im Medium befindet. Andernfalls könnten Ergebnisse verfälscht bzw. falsch interpretiert werden.

3.5 Ergebnisse

3.5.1 Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen auf den 86-Rubidiumefflux aus Langerhansschen Inseln

Von Henquin, 1980a sowie auch Carpinelli und Malaisse, 1981 wurde schon gezeigt, daß das Ausmaß der Kaliumpermeabilitätshemmung von der Konzentration der Glucose im Medium abhängig ist, mit der Einschränkung, daß diese Aussage nur in einem Konzentrationsbereich zwischen 0 mM und 6 mM (Henquin) bzw. 0 mM und 8,3 mM (Carpinelli) gültig ist; bei weiterer Steigerung der Glucosekonzentration kann keine weitere Verminderung (Henquin, 1980a), sondern sogar ein umgekehrter Effekt, eine leichte Erhöhung der Kaliumpermeabilität, festgestellt werden (Carpinelli und Malaisse, 1981). Da die Arbeit von Henquin nur einen festgelegten Zeitpunkt betrachtet (30 bzw. 60 Minuten) und die Glucosekonzentration während der gesamten Perifusionsdauer konstant gehalten wurde, und auch Carpinelli in seiner Arbeit zwar vielerlei Glucosekonzentrationen in den verschiedenen Phasen der Perifusion miteinander kombiniert, die aber kein einheitliches Gesamtbild zulassen, sollte hier eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Glucosekonzentration und 86-Rubidiumefflux derart hergestellt werden, daß in den verschiedenen Versuchsgruppen nur das Medium in Phase 2 der Perifusion unterschiedlich gewählt wurde, während in den Phasen 1 und 3 der Perifusion gleiche Bedingungen, d.h. gleiche Glucosekonzentrationen, verwendet wurden.

Aus den Abbildungen Nr. 22, 23, 24 und 25 sowie den Werten, dargestellt in Tabelle VII, ist ersichtlich, daß sich die Hemmwirkungen verschiedener Glucosekonzentrationen auf den 86-Rubidiumefflux auch in einem Bereich oberhalb von 5,6 mM unterscheiden lassen.

Bei Zuschalten von 5,6, 11,2 oder 16,7 mM Glucose tritt sehr schnell (Maximaleffekt jeweils in der 3. Fraktion nach dem Umschalten) der Hemmeffekt auf den 86-Rubidiumefflux ein.

Während bei der Kurve Abb. 23 (5,6 mM) eine nahezu konstante Effluxrate während der gesamten Phase 2 festgestellt werden kann, ist sowohl in Abbildung 24 (11,2 mM) als auch in Abbildung 25 (16,7 mM) eine sofort nach Erreichen des Maximaleffektes auftretende Gegenregulation, d.h. Erhöhung der 86-Rubidiumeffluxrate, zu beobachten, die um so größer ausfällt, je höher die Glucosekonzentration im Medium war (vgl. Abb. 24 und 25).

Der Hemmeffekt auf die Kaliumpermeabilität von Glucose 11,2 mM ist trotz Gegenregulation größer als der von Glucose 5,6 mM (Q = 0.4423 (11,2 mM) und Q = 0.487 (5,6 mM)).

Glucose 16,7 mM dagegen üben keine größere Hemmung auf die Kaliumpermeabilität aus als Glucose 11,2 mM; die Effluxratenverminderung ist auch geringer als diejenige, die mit Glucose 5,6 mM im Medium erzielt wird (Q = 0.5494 (16,7 mM)).

Bei Rückschalten auf das Medium, das jeweils wieder Glucose 3 mM enthält (Phase 3), kann festgestellt werden, daß die Reaktion um so rascher eintritt, je geringer die Glucosekonzentration im Medium während Phase 2 gewesen ist.

Während bei Kurve Abb. 23 (5,6 mM) bereits in der 2. Fraktion

Medium Phase 1 Minute 20 - 40	Medium Phase 2 Minute 40 - 70	Medium Phase 3 Minute 70 - 90	Quotient Q ± SEM	Abb.Nr.
Glucose 3 mM	Glucose 3 mM	Glucose 3 mM	0.9131 ± 0.0113 (4)	22 a
Glucose 3 mM	Glucose 5,6 mM	Glucose 3 mM	0.487 ± 0.003 (3)	23 b
Glucose 3 mM	Glucose 11,2 mM	Glucose 3 mM	0.4423 ± 0.0082 (3)	24 c
Glucose 3 mM	Glucose 16,7 mM	Glucose 3 mM	0.5494 ± 0.0068 (3)	25 d

Tabelle VII: Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen auf den 86-Rubidiumefflux aus isolierten Langerhansschen Inseln.
Jeweils 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer. Medium: KRB, RSA 5 ‰, Glucose wie angegeben.
Anzahl der Einzelversuche (n) in Klammern.

$$\text{Quotient } Q = \frac{\text{Effluxrate Fraktion 19, 20, 21}}{\text{Effluxrate Fraktion 8, 9, 10}}$$

t-test: ab, ac, ad, bd, cd $p < 0.001$
bc $p < 0.01$

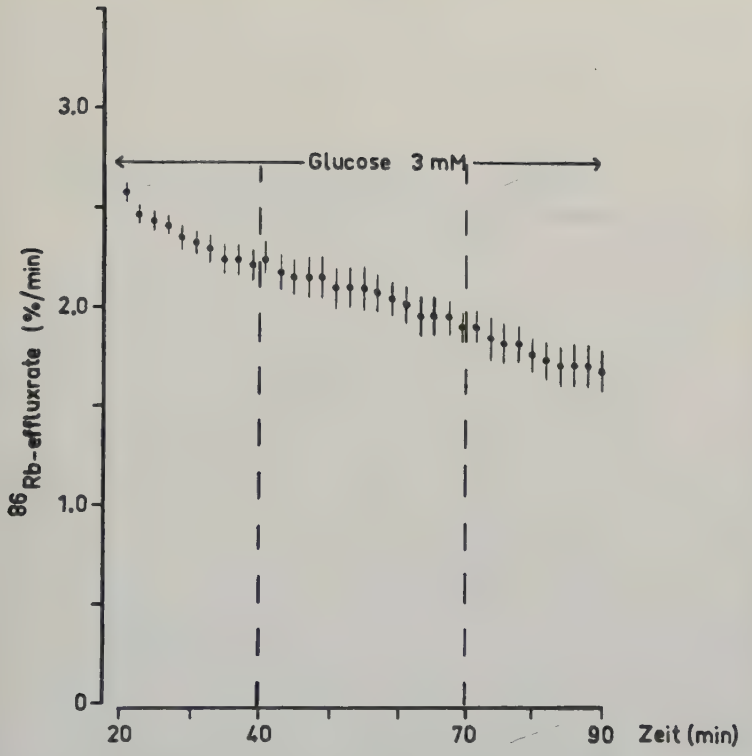


Abb. 22: Einfluß von Glucose 3 mM auf den ^{86}Rubidiumefflux isolierter Langerhansscher Inseln.
Je 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer.
Phasen 1, 2 und 3: KRB, Glucose 3 mM, RSA 5 %.
Mean ± SEM aus 4 Versuchen

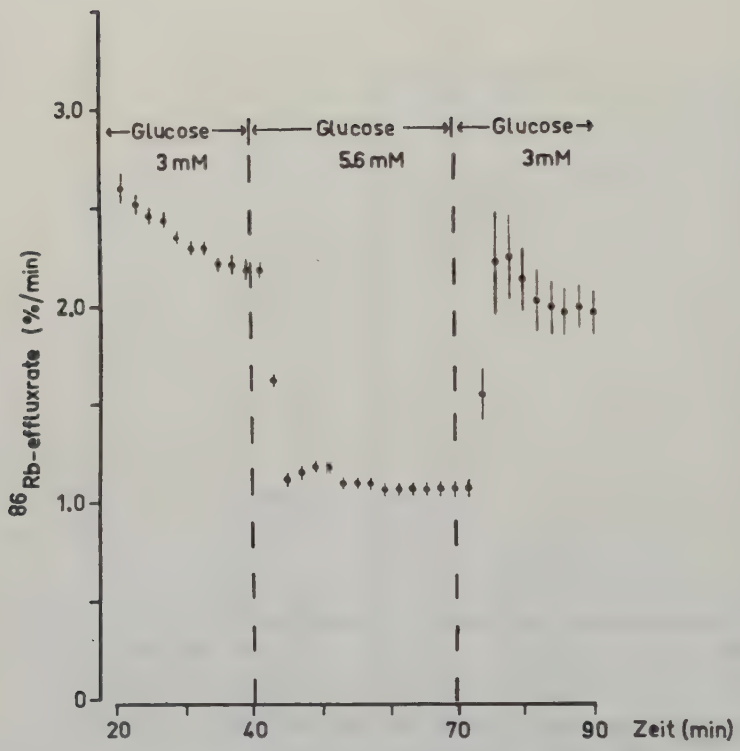


Abb. 23: Einfluß von Glucose 5,6 mM auf den ^{86}Rubidiumefflux isolierter Langerhansscher Inseln.
Je 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer.
Phasen 1 und 3: KRB, Glucose 3 mM, RSA 5 %.
Phase 2 : KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 %.
Mean ± SEM aus 3 Versuchen

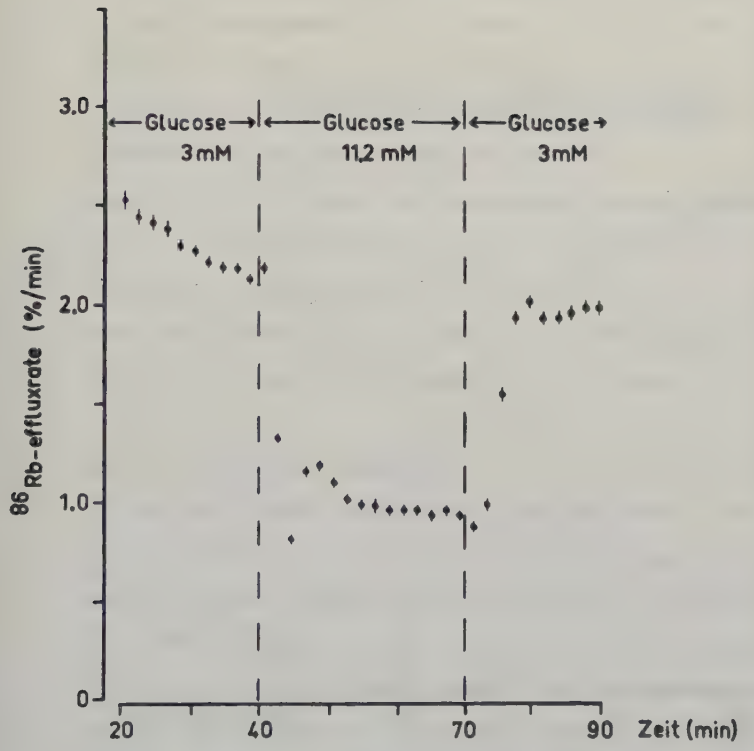


Abb. 24: Einfluß von Glucose 11,2 mM auf den ^{86}Rubidiumefflux isolierter Langerhansscher Inseln.
Je 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer.
Phasen 1 und 3: KRB, Glucose 3 mM, RSA 5 %.
Phase 2 : KRB, Glucose 11,2 mM, RSA 5 %.
Mean ± SEM aus 3 Versuchen

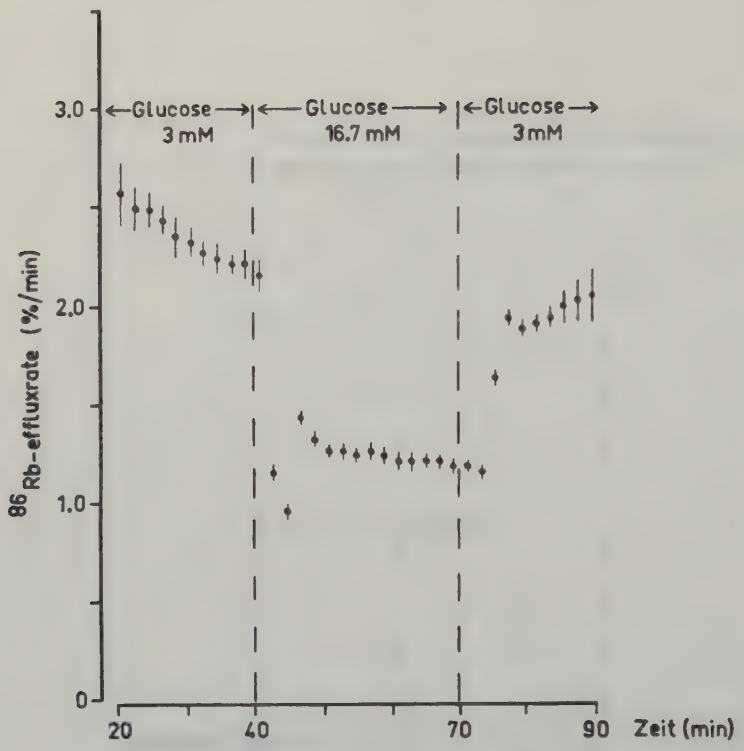


Abb. 25: Einfluß von Glucose 16,7 mM auf den ^{86}Rubidium-efflux isolierter Langerhansscher Inseln.
Je 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer.
Phasen 1 und 3: KRB, Glucose 3 mM, RSA 5 %.
Phase 2 : KRB, Glucose 16,7 mM, RSA 5 %.
Mean ± SEM aus 3 Versuchen

nach dem Rückschalten eine deutliche Zunahme der 86-Rubidium-effluxrate festzustellen ist, wird dies in Kurve Abb. 24 (11,2 mM) in der 2. Fraktion erst angedeutet und in Kurve Abb. 25 (16,7 mM) ist in der 2. Fraktion nach dem Umschaltvorgang noch keine Erhöhung der Fluxrate festzustellen.
Auch verlaufen die Kurven nach Erreichen des Maximums in Phase 3 nicht gleichartig. Während Kurve Abb. 23 eine deutliche Abwärtsbewegung, d.h. Verminderung der Effluxrate, zeigt, ist in Kurve Abb. 24 eine nahezu konstante Fluxrate und in Kurve Abb. 25 eine Zunahme der 86-Rubidiumeffluxrate zu erkennen.

Im Vergleich der Kurven Abb. 23, 24 und 25 mit der Kurve Abb. 22, bei der das Medium während Phase 2 der Perifusion Glucose in einer Konzentration von 3 mM enthielt, kann festgestellt werden, daß durch Erhöhung der Glucosekonzentration im Medium eine konstante Effluxrate erreicht werden kann (in der Abbildung = Parallele zur Abszisse), wohingegen in Anwesenheit von Glucose 3 mM im Medium die Effluxrate als Funktion der Zeit absinkt.
Dieser Effekt ist ebenso zu beobachten, wenn jeweils die Phasen 1 mit den Phasen 2 der einzelnen Kurven verglichen werden.
Nicht nur, daß durch Erhöhung der Glucosekonzentration die Effluxrate absinkt, sondern die 86-Rubidiumeffluxrate weist unter Einwirkung höherer Glucosekonzentrationen einen nahezu konstanten Wert auf (bei Kurve Abb. 24 und 25 die Gegenregulationsphase ausgenommen).

3.5.2 Einfluß von Streptozocin auf den 86-Rubidiumefflux aus Langerhansschen Inseln in Anwesenheit von Glucose 5,6 mM

Da Streptozocin als diabetogene Substanz in der Lage ist, die glucoseinduzierte Insulinsekretion zu hemmen (Golden et al., 1971), wurde vermutet, daß auch bei Untersuchung des Parameters '86-Rubidiumefflux' diese Substanz dem physiologischen Stimulus Glucose entgegenwirkt, d.h. in diesem Modell die 86-Rubidiumeffluxrate zu steigern vermag. Dies hat sich in Vorversuchen bestätigt. Daher wurde für das Perifusionsmedium eine Glucosekonzentration von 5,6 mM gewählt, da hier die Kaliumpermeabilität weitgehend gehemmt ist, nicht aber schon durch andere Ionenfluxe gegenreguliert wird (3.5.1).

In den Abbildungen Nr. 26, 27, 28, 29 und 30 sowie Tabelle VIII sieht man,

a) daß durch Glucose 5,6 mM die 86-Rubidiumeffluxrate über die gesamte Perifusionsdauer nahezu konstant bleibt, Quotient 0.9 (Abb. 26).

b) daß Streptozocin dosisabhängig der durch Glucose 5,6 mM hervorgerufenen Hemmung der Kaliumpermeabilität entgegenwirken kann, wobei bereits eine Konzentration von 0,075 mg/ml Streptozocin ausreicht (Abb. 28), um die Kaliumpermeabilität signifikant gegenüber der Vergleichskurve (Abb. 26) zu steigern ($p < 0.01$).

c) daß durch Zuschalten eines Mediums mit Streptozocin 0,5 mg/ml eine ebensostarke Vergrößerung des 86-Rubidiumefflu-

Medium Phase 1 Minute 20 - 40	Medium Phase 2 Minute 40 - 70	Medium Phase 3 Minute 70 - 90	Quotient Q ± SEM	Abb.Nr.
Glucose 5,6 mM	Glucose 5,6 mM	Glucose 5,6 mM	0.9 ± 0.0329 (4)	26 e
Glucose 5,6 mM	Glucose 3 mM	Glucose 5,6 mM	1.9533 ± 0.104 (4)	27 f
Glucose 5,6 mM	Glucose 5,6 mM + Streptozocin 0,075 mg/ml	Glucose 5,6 mM	1.0512 ± 0.0193 (5)	28 g
Glucose 5,6 mM	Glucose 5,6 mM + Streptozocin 0,2 mg/ml	Glucose 5,6 mM	1.1883 ± 0.0153 (4)	29 h
Glucose 5,6 mM	Glucose 5,6 mM + Streptozocin 0,5 mg/ml	Glucose 5,6 mM	1.7259 ± 0.0654 (6)	30 i

Tabelle VIII: Einfluß von Streptozocin auf den 86-Rubidiumefflux aus isolierten Langerhansschen Inseln. Jeweils 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer. Medium: KRB, RSA 5 %, Glucose wie angegeben.
Anzahl der Einzelversuche (n) in Klammern.

t-test: ef, eh, ei, gh, gi, hi $p < 0.001$
eg $p < 0.01$
fi n.s.

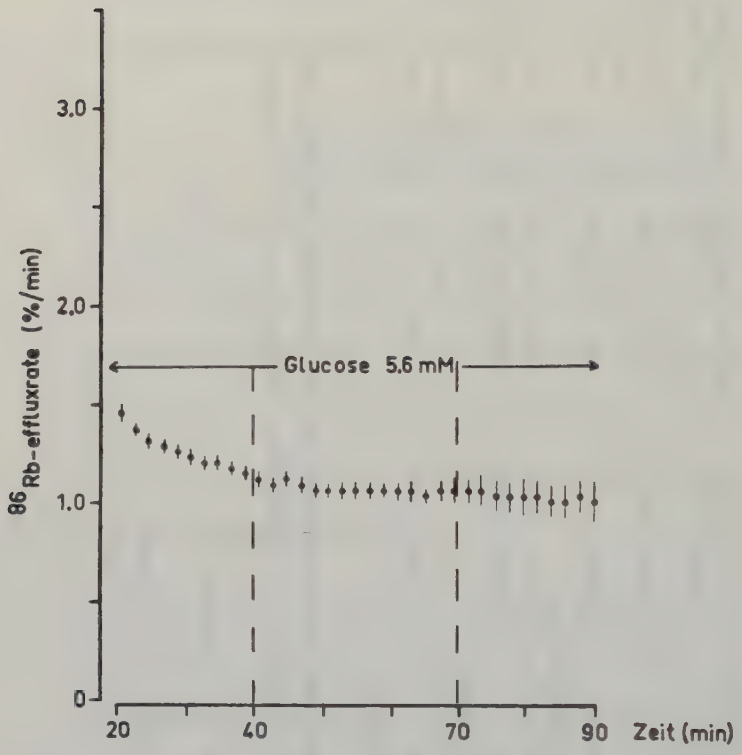


Abb. 26: Einfluß von Glucose 5,6 mM auf den ^{86}Rubidiumefflux isolierter Langerhansscher Inseln.
Je 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer.
Phasen 1, 2 und 3: KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 %.
Mean ± SEM aus 4 Versuchen

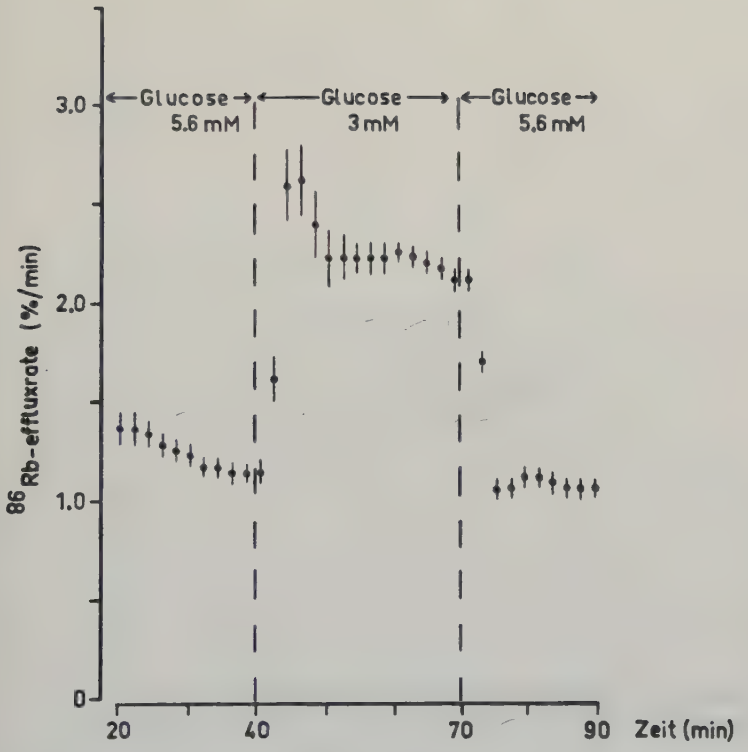


Abb. 27: Einfluß von Glucose 3 mM auf den ^{86}Rubidiumefflux isolierter Langerhansscher Inseln.
Je 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer.
Phasen 1 und 3: KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 %.
Phase 2 : KRB, Glucose 3 mM, RSA 5 %.
Mean ± SEM aus 4 Versuchen

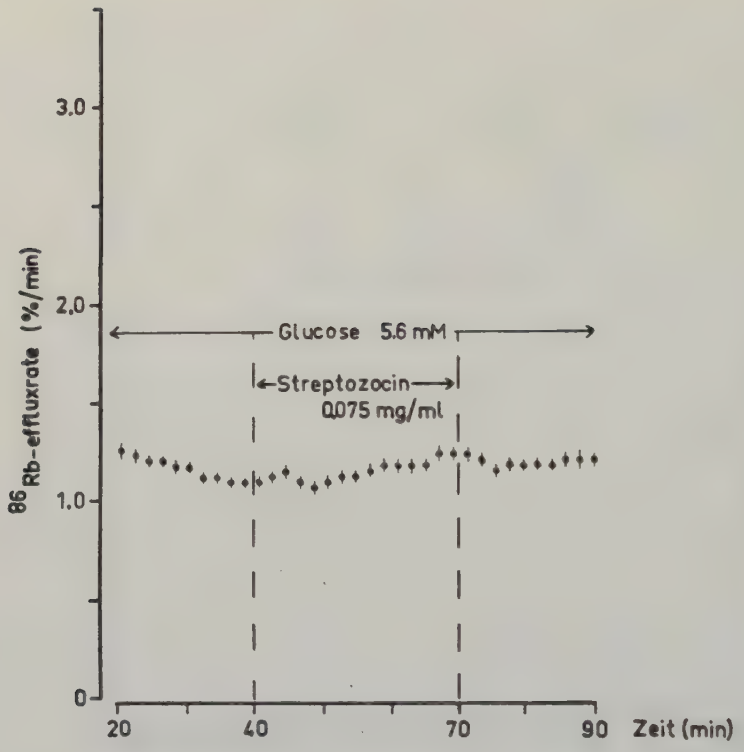


Abb. 28: Einfluß von Streptozocin 0,075 mg/ml auf den ^{86}Rubidiumefflux isolierter Langerhansscher Inseln in Gegenwart von Glucose 5,6 mM.
Je 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer.
Phasen 1 und 3: KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 %
Phase 2 : KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 %, Streptozocin 0,075 mg/ml
Mean ± SEM aus 5 Versuchen

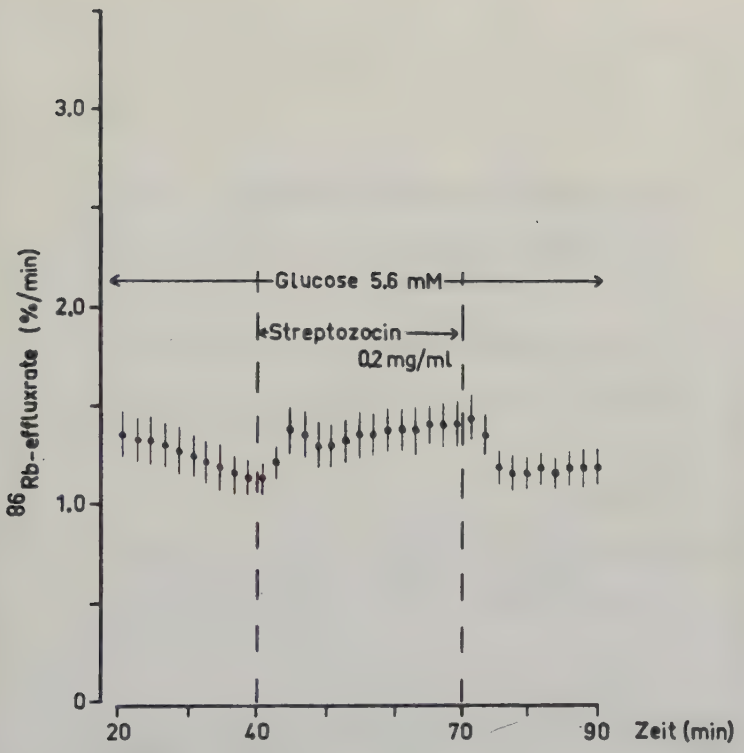


Abb. 29: Einfluß von Streptozocin 0,2 mg/ml auf den ^{86}Rubidiumefflux isolierter Langerhansscher Inseln in Gegenwart von Glucose 5,6 mM.
Je 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer.
Phasen 1 und 3: KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 %.
Phase 2 : KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 %, Streptozocin 0,2 mg/ml
Mean ± SEM aus 4 Versuchen

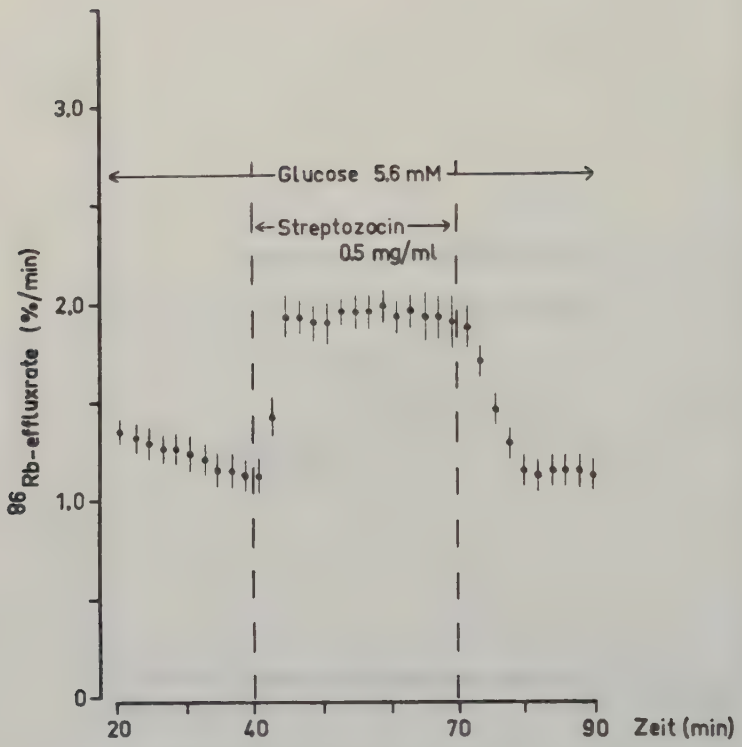


Abb. 30: Einfluß von Streptozocin 0,5 mg/ml auf den ^{86}Rubidiumefflux isolierter Langerhansscher Inseln in Gegenwart von Glucose 5,6 mM.
Je 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer.
Phasen 1 und 3: KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 %.
Phase 2 : KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 %, Streptozocin 0,5 mg/ml
Mean ± SEM aus 6 Versuchen

xes erzielt werden kann (Abb. 30), wie durch Umschalten auf ein Medium, das während Phase 2 der Perifusion Glucose 3 mM enthält (Abb. 27).

d) daß der Effekt der Permeabilitätserhöhung durch Streptozocin in allen verwendeten Konzentrationen sehr schnell eintritt (Maximum in der 3. Fraktion nach dem Umschalten).

e) daß die durch Streptozocin hervorgerufene Effluxratensteigerung nach Rückschalten auf streptozocinfreies Medium vollständig reversibel ist.

3.5.3 Einfluß von exogenem Insulin auf den 86-Rubidiumefflux aus Langerhansschen Inseln in Anwesenheit von Glucose 5,6 mM

Da in unserem Arbeitskreis und von anderen bereits gezeigt werden konnte, daß exogenes Insulin in der Lage ist, die glucoseinduzierte Insulinsekretion zu hemmen (Ammon und Verspohl, 1976), sowie die glucoseinduzierte 45-Calciumaufnahme in Langerhanssche Inseln zu vermindern vermag (unveröffentlicht), wurde in gleicher Überlegung wie bei Untersuchung des Streptozocin (3.5.2) ein Perifusionsmedium mit Glucose 5,6 mM gewählt, dem in Phase 2 das exogene Insulin in den entsprechenden Konzentrationen zugeschaltet wurde.

In den Abbildungen 31, 32 und 33 sowie Tabelle IX wird gezeigt, daß exogenes Insulin in Konzentrationen von 200 µE/ml und 800

Medium Phase 1 Minute 20 - 40	Medium Phase 2 Minute 40 - 70	Medium Phase 3 Minute 70 - 90	Quotient Q ± SEM	Abb.Nr.
Glucose 5,6 mM	Glucose 5,6 mM	Glucose 5,6 mM	0.9 ± 0.0329 (4)	31 k
Glucose 5,6 mM	Glucose 5,6 mM + Insulin 200 µE/ml	Glucose 5,6 mM	0.9515 ± 0.0194 (6)	32 l
Glucose 5,6 mM	Glucose 5,6 mM + Insulin 800 µE/ml	Glucose 5,6 mM	0.9287 ± 0.0156 (5)	33 m

Tabelle IX: Einfluß von exogenem Insulin 200 und 800 µE/ml auf den 86-Rubidiumefflux aus isolierten Langerhansschen Inseln in Gegenwart von Glucose 5,6 mM.
Jeweils 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer. Medium: KRB, RSA 5 %, Glucose wie angegeben.
Anzahl der Einzelversuche (n) in Klammern.

Varianzanalyse n.s.

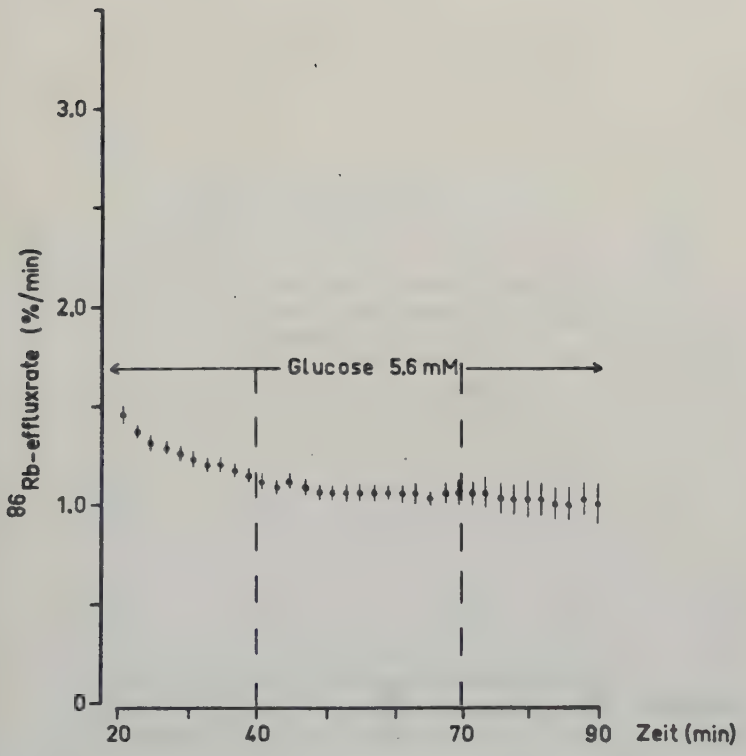


Abb. 31: Einfluß von Glucose 5,6 mM auf den ^{86}Rubidium-efflux isolierter Langerhansscher Inseln.
Je 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer.
Phasen1, 2 und 3: KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 ‰
Mean ± SEM aus 4 Versuchen

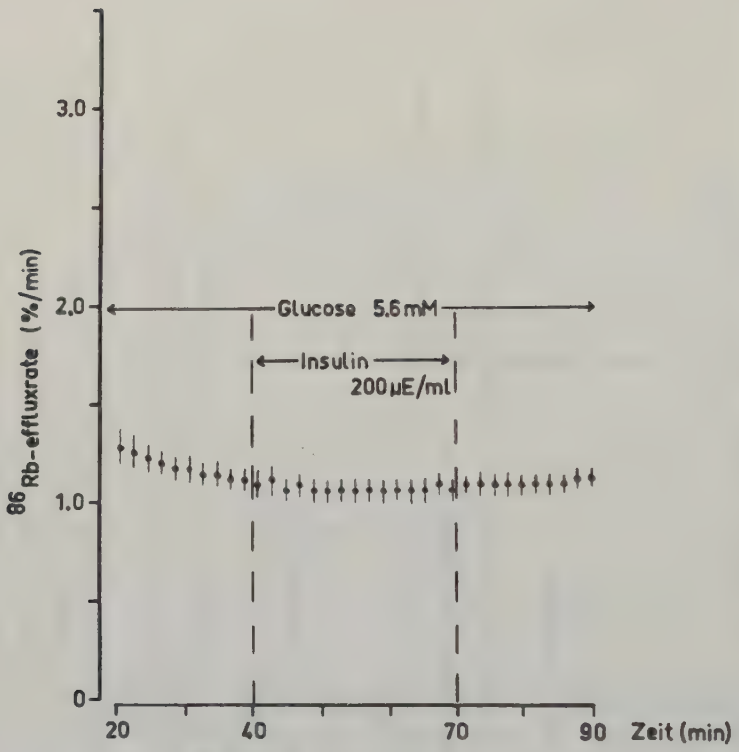


Abb. 32: Einfluß von exogenem Insulin 200 µE/ml auf den ^{86}Rubidiumefflux isolierter Langerhansscher Inseln in Gegenwart von Glucose 5,6 mM.
Je 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer.
Phasen 1 und 3: KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 %
Phase 2 : KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 %, Insulin 200 µE/ml
Mean ± SEM aus 6 Versuchen

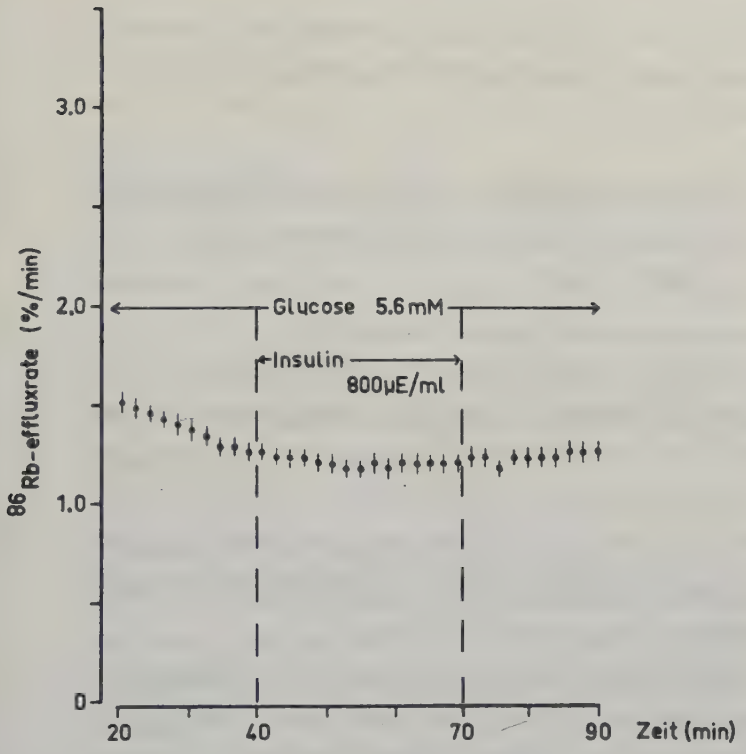


Abb. 33: Einfluß von exogenem Insulin 800 µE/ml auf den ^{86}Rubidiumefflux isolierter Langerhansscher Inseln in Gegenwart von Glucose 5,6 mM.
Je 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer.
Phasen 1 und 3: KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 %.
Phase 2 : KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 %, Insulin 800 µE/ml
Mean ± SEM aus 5 Versuchen

µE/ml keinen Einfluß auf die Kaliumpermeabilität Langerhansscher Inseln in Anwesenheit von Glucose 5,6 mM hat.

3.5.4 Einfluß von exogenem Insulin auf den 86-Rubidiumefflux aus Langerhansschen Inseln in Anwesenheit von Glucose 16,7 mM

Von verschiedenen Autoren konnte gezeigt werden, daß eine Erhöhung der Glucosekonzentration von einem mittleren Level aus (ca. 5 mM) auf höhere Glucosekonzentrationen, die in der Lage sind, die Insulinsekretion zu stimulieren, nicht mit einer weiteren Verminderung der Kaliumpermeabilität, sondern mit einer Erhöhung der 86-Rubidiumeffluxrate einhergeht (Carpinelli und Malaisse, 1981; Lebrun et al., 1982).
Da bereits nachgewiesen werden konnte, daß exogenes Insulin im Rahmen der feed-back-Regulation seiner eigenen Sekretion die durch Glucose 20 mM induzierte 45-Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel zu hemmen vermag (Ammon et al., unveröffentlicht), sollte im folgenden untersucht werden, inwieweit die Kaliumpermeabilität der ß-Zelle in Anwesenheit einer stimulatorischen Glucosemenge (3 mg/ml) durch exogenes Insulin beeinflußt werden kann.

In Abbildung 34 kann gezeigt werden, daß die von anderen Autoren beschriebene Zunahme der Kaliumpermeabilität beim Umschalten von Glucose 5,6 mM auf Glucose 16,7 mM auch mit diesem System gefunden wird.
(Quotient 1.0767 (16,7 mM) gegenüber 0.90 (5,6 mM, Abb. 31)).

Daß diese Zunahme der Kaliumpermeabilität an die Anwesenheit von Calciumionen gebunden ist, kann aus Abbildung 35 entnommen werden.
Hier wurden Calciumionen äquimolar gegen Magnesiumionen im Medium ausgetauscht, eine Veränderung, wie sie von anderen Autoren ebenfalls beschrieben wird (Henquin, 1979). Allerdings muß bereits 5 Minuten vor Zusatz der höheren Glucosekonzentration (16,7 mM) auf dieses Ca-freie, Mg-haltige Medium umgeschaltet werden, um alle Calciumionen aus dem die Langerhansschen Inseln umgebenden Medium zu entfernen.

Man erkennt, daß bei Abwesenheit von Calciumionen im Medium Glucose 16,7 mM keine Erhöhung der Kaliumpermeabilität hervorruft, sondern die durch Glucose 5,6 mM hervorgerufene Hemmung der 86-Rubidiumeffluxrate nochmals weiter zu steigern vermag ($Q = 0.7727$).

Schaltet man wieder auf das calciumhaltige Medium zurück (Phase 3), so ist dies mit einer kurzzeitigen, sehr schnellen und massiven Vergrößerung der Kaliumpermeabilität verbunden.

Nachdem nun eine Beziehung zwischen den Kalium- und den Calciumfluxen in diesem Modell hergestellt war, sollte nun der Einfluß von exogenem Insulin untersucht werden.
Bei diesen Versuchen wurde bereits 5 Minuten vor Umschalten auf das Medium mit Glucose 16,7 mM das exogene Insulin zugesetzt (das in Anwesenheit von Glucose 5,6 mM keinen Einfluß auf die

Medium Phase 1 Minute 20 - 40	Medium Phase 2 Minute 40 -70	Medium Phase 3 Minute 70 - 90	Quotient Q ± SEM	Abb.Nr.
Glucose 5,6 mM	Glucose 16,7 mM	Glucose 5,6 mM	1.0767 ± 0.0337 (5)	34 n
Glucose 5,6 mM	Glucose 16,7 mM Calciumfreies Medium	Glucose 5,6 mM	0.7727 ± 0.0339 (6)	35 o
Glucose 5,6 mM	Glucose 16,7 mM + Insulin 200 µE/ml	Glucose 5,6 mM	0.9813 ± 0.022 (5)	36 p
Glucose 5,6 mM	Glucose 16,7 mM + Insulin 800 µE/ml	Glucose 5,6 mM	0.9253 ± 0.0218 (6)	37 q

Tabelle X: Einfluß von exogenem Insulin 200 und 800 µE/ml auf den 86-Rubidiumefflux aus isolierten Langerhansschen Inseln in Gegenwart von Glucose 16,7 mM.
Jeweils 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer. Medium: KRB, RSA 5 %, Glucose wie angegeben. Zusätzliche Stoffe in Phase 2 wurden bereits 5 Minuten vor dem Umschalten auf höhere Glucosekonzentration zugesetzt.
Anzahl der Einzelversuche (n) in Klammern.
t-test: no, op $p < 0.001$
nq, oq $p < 0.01$
np $p < 0.05$
pq n.s.

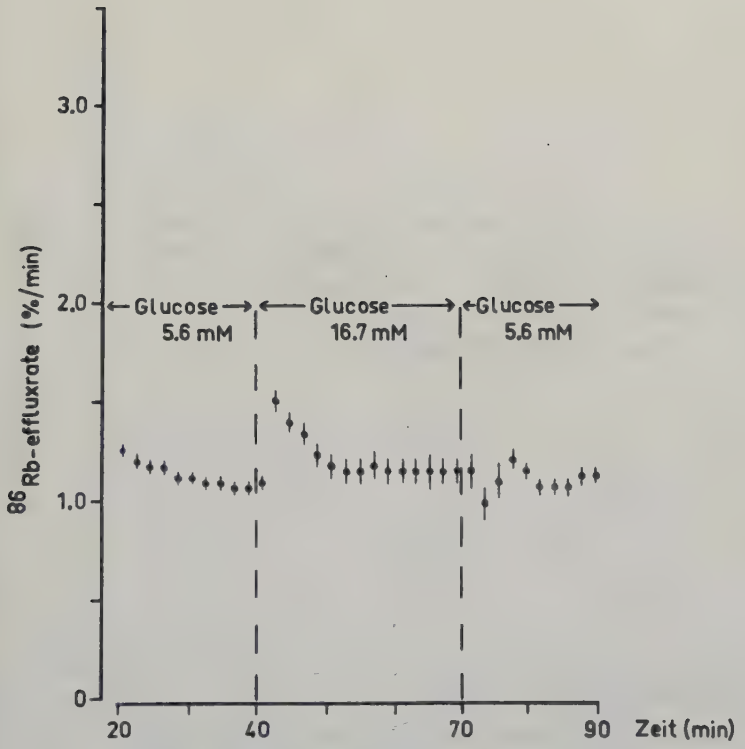


Abb. 34: Einfluß von Glucose 16,7 mM auf den ^{86}Rubidium-efflux isolierter Langerhansscher Inseln.
Je 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer.
Phasen 1 und 3: KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 ‰
Phase 2 : KRB, Glucose 16,7 mM, RSA 5 ‰
Mean ± SEM aus 5 Versuchen

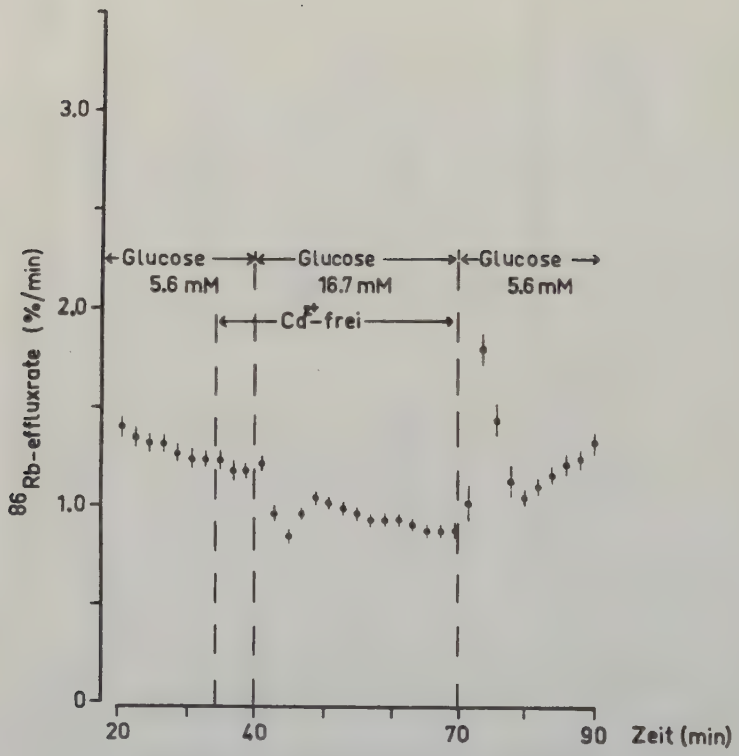


Abb. 35: Einfluß von Glucose 16,7 mM auf den ^{86}Rubidium-efflux isolierter Langerhansscher Inseln in calciumfreien Medium.
Je 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer.
Phasen 1 und 3: KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 %.
Phase 2 : KRB, Glucose 16,7 mM, RSA 5 %.
5 Minuten vor Zusatz der höheren Glucosekonzentration wurde auf das calciumfreie Medium umgeschaltet.
Mean ± SEM aus 6 Versuchen

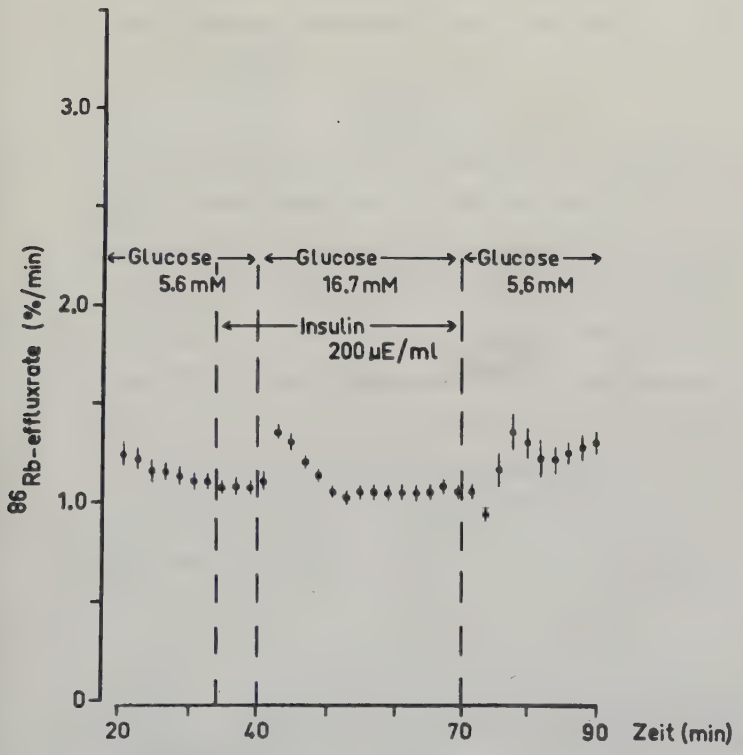


Abb. 36: Einfluß von exogenem Insulin 200 µE/ml auf den ^{86}Rubidiumefflux isolierter Langerhansscher Inseln in Gegenwart von Glucose 16,7 mM.
Je 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer.
Phasen 1 und 3: KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 %.
Phase 2 : KRB, Glucose 16,7 mM, RSA 5 %.
Bereits 5 Minuten vor Zusatz der höheren Glucosekonzentration wurde das exogene Insulin 200 µE/ml zugeschaltet.
Mean ± SEM aus 5 Versuchen

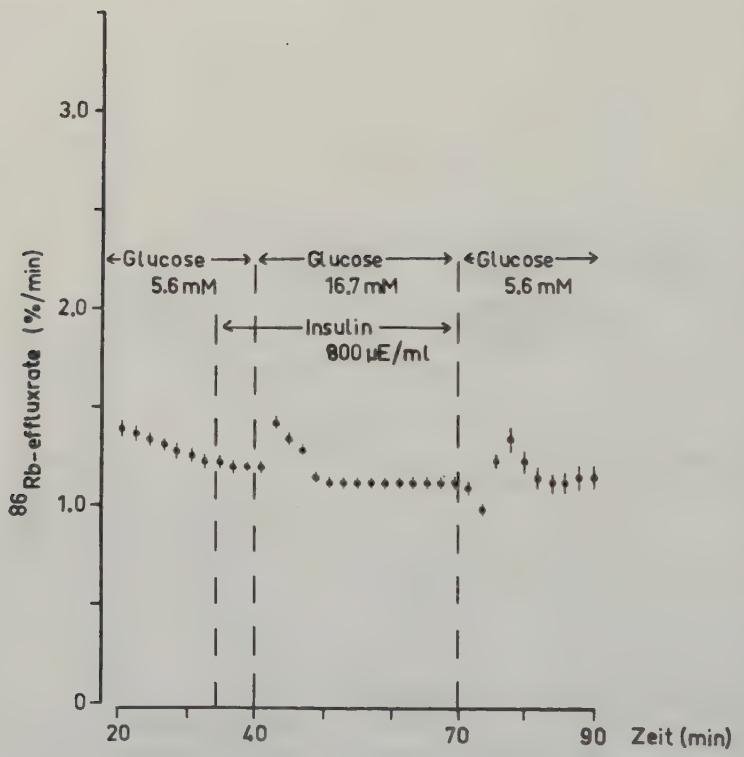


Abb. 37: Einfluß von exogenem Insulin 800 µE/ml auf den ^{86}Rubidiumefflux isolierter Langerhansscher Inseln in Gegenwart von Glucose 16,7 mM.
Je 40 Langerhanssche Inseln pro Perifusionskammer.
Phasen 1 und 3: KRB, Glucose 5,6 mM, RSA 5 ‰
Phase 2 : KRB, Glucose 16,7 mM, RSA 5 ‰
5 Minuten vor Zusatz der höheren Glucosekonzentration wurde das Insulin 800 µE/ml zugeschaltet.
Mean ± SEM aus 6 Versuchen

Kaliumpermeabilität zeigt (3.5.3)), um sichergehen zu können, daß die Wirkung von exogenem Insulin durch den sehr schnell eintretenden Effekt von Glucose 16,7 mM nicht überdeckt wird.

In den Abbildungen 36 und 37 sowie Tabelle X sind die Wirkungen von exogenem Insulin 200 µE/ml und 800 µE/ml auf die Kaliumpermeabilität in Anwesenheit von Glucose 16,7 mM dargestellt.

Im Vergleich mit Abbildung 34 (Glucose 16,7 mM in Phase 2) kann festgestellt werden, daß exogenes Insulin dosisabhängig die Kaliumpermeabilität in Anwesenheit von Glucose 16,7 mM senkt. Die Quotienten unterscheiden sich jeweils signifikant von demjenigen, der mit der Vergleichskurve erhalten wird ($p < 0.05$ für Insulin 200 µE/ml, $p < 0.01$ für Insulin 800 µE/ml).

4. D I S K U S S I O N

4.1 Bedeutung von Rinderserumalbumin für die Funktionsfähigkeit der Langerhansschen Insel

Im Rahmen der Untersuchungen zur 86-Rubidiumaufnahme in die Langerhanssche Insel konnte festgestellt werden, daß die Anwesenheit von Rinderserumalbumin für die Erhaltung eines einmal erreichten Gleichgewichtszustandes der Rubidiumaufnahme in die Langerhanssche Insel notwendig ist (3.3.12).
Es wird im folgenden versucht, die Aufgaben von Rinderserumalbumin für in-vitro-Versuche mit isolierten Langerhansschen Inseln etwas näher zu betrachten:
Zwar besitzt Rinderserumalbumin für die Wiederfindung von Insulin bei der Bestimmung von Insulin im Radioimmunoassay eine Bedeutung, da Insulin während 90-minütiger Inkubation in Abwesenheit - nicht aber bei Zusatz von Rinderserumalbumin - teilweise zerstört oder so verändert wird, daß es im Radioimmunoassay nicht mehr nachgewiesen werden kann (3.7). Dem kommt allerdings keine physiologische Bedeutung zu, da Insulin als Protein hier durch die langandauernde Inkubation bedingt verändert werden dürfte. Eine Rolle für solche Veränderungen spielen sicher die Faktoren Temperatur (37°C), pH-Wert-Veränderungen des Mediums im Verlauf der Inkubation und auch Adsorption einer gewissen Menge Insulin an das Inkubationsgefäß. Hier übt das Albumin wohl eine Schutzfunktion für das Protein Insulin aus.
Hinsichtlich der Bedeutung des Albumins für die Funktion der

Langerhansschen Insel besteht eine Diskrepanz zwischen den Parametern Insulinsekretion einerseits und Rubidiumaufnahme bzw. Erhaltung eines Gleichgewichtszustandes der Rubidiumaufnahme andererseits. Denn die Langerhanssche Insel ist in der Lage,

1. 3 Stunden lang in einem Medium ohne Rinderserumalbumin zu überleben, um anschließend auf Glucosereiz hin mit einer Insulinsekretion zu reagieren, deren Ausmaß mit dem Langerhansscher Inseln, die in einem albuminhaltigen Medium inkubiert wurden, vergleichbar ist (3.7).
2. auch in einem rinderserumalbuminfreien Medium auf Glucosereiz Insulin zu sezernieren (Eine Aussage über die Menge des abgegebenen Insulins kann aber - wegen des Verlaufs der Eichkurve - nur mit Einschränkung getroffen werden; 3.7).

Ionenfluxe durch Membranen scheinen sehr viel sensibler als der Vorgang der Insulinsekretion auf Änderungen der Umgebung oder auf Beeinträchtigungen des physiologischen Milieus zu reagieren.
Solch eine unterschiedliche Reaktion verschiedener Parameter wird auch von anderer Seite bestätigt:
So findet Meissner (persönliche Mitteilung) bei Verwendung von Tris-Puffer als Medium keine Ausbildung von Aktionspotentialen der ß-Zelle auf Glucosereiz hin, dagegen wird in einem solchen Medium eine Steigerung der 45-Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel (Ammon et al., 1983) sowie auch eine Stimulation der Insulinsekretion auf Glucosereiz hin (Hellman et al., 1974) festgestellt.

Mehrere Möglichkeiten für die Bedeutung von Rinderserumalbumin können diskutiert werden:

1. Nicht zutreffend scheint die Überlegung, daß Rinderserumalbumin die Aufgabe der Erhaltung eines kolloidosmotischen Druckes in dem die Langerhanssche Insel umgebenden Medium zukommt, da in Versuchen mit Dextran, das ebenfalls einen kolloidosmotischen Druck ausübt, im Medium kein Gleichgewichtszustand hinsichtlich der 86-Rubidiumaufnahme in die Langerhanssche Insel erreicht werden konnte (3.3.8.2).

2. Es könnte sein, daß einzelne Bestandteile des Rinderserumalbumins, das keine einheitliche Zusammensetzung aufweist, für die Physiologie der Zellmembranen der Langerhansschen Insel eine Rolle spielen, und zwar derart, daß diese Bestandteile für die Intaktheit der Membranen verantwortlich sind. Diese Aufgabe könnte z.B. von einzelnen Aminosäuren des Rinderserumalbumins übernommen werden. Fehlen solche Aminosäuren bzw. Rinderserumalbumin, wird die Membran in ihren physiologischen Eigenschaften gestört. Der Vorgang der Rubidiumaufnahme und Erhaltung eines Gleichgewichtszustandes könnte bei einer Schädigung der Zellmembran in Abwesenheit von Rinderserumalbumin sehr viel stärker betroffen sein als der Vorgang der Insulinsekretion.

3. Es ist denkbar, daß bei Langerhansschen Inseln, die mit Hilfe der Collagenasemethode gewonnen werden, durch Protea-

senaktivität Proteinanteile von Membranen so verändert werden, daß eine Erhaltung eines Gleichgewichtszustandes der Rubidiumaufnahme in die ß-Zelle nicht mehr gewährleistet ist. Rinderserumalbumin oder wiederum einzelne Bestandteile davon könnten hier eine Reparatur der geschädigten Membran ermöglichen bzw. erleichtern.

Von Hahn und Mitarbeitern, 1976 konnte im Vergleich zwischen microdissezierten und collagenase-isolierten Langerhansschen Inseln bei letzteren eine Erhöhung der basalen, aber eine deutliche Verminderung der glucoseinduzierten Insulinsekretion festgestellt werden, was auf eine Schädigung der ß-Zellen durch Collagenasebehandlung zurückgeführt wird.

Diese Betrachtungsweise wird durch die Tatsache bestärkt, daß diejenigen Autoren, die ohne Rinderserumalbumin im Medium Versuche zur Rubidiumaufnahme bzw. Rubidiumefflux durchführen, generell die Langerhansschen Inseln nach der Microdissectionsmethode gewinnen (Hellman, Idahl, Lernmark, Sehlin, Täljedal), diejenigen aber, die Collagenase zur Inselgewinnung einsetzen - ohne dies allerdings zu begründen -, generell ein Medium mit Rinderserumalbumin verwenden (Boschero, Malaisse, Carpinelli, Henquin).

4.2 Bestimmung des 86-Rubidiumeffluxes aus isolierten Langerhansschen Inseln. Vergleich: Statikmessung und Perifusionsmethode

Wie in der vorliegenden Arbeit dargestellt (3.4.3, 3.4.4), ist für die Betrachtung der Kaliumpermeabilität die statische Bestimmung (= Inkubationsmethode) des 86-Rubidiumeffluxes aus isolierten Langerhansschen Inseln unzureichend, da diese Methode ausschließlich - und auch das nur bei einer hohen Versuchsanzahl (n) - für sehr große Unterschiede (z.B. Glucose 3 mM und Glucose 20 mM; Sehlin und Täljedal, 1974) ein aussagekräftiges Ergebnis liefert.

Für die zwischen diesen beiden 'Maxima' anzusiedelnden Effekte erweist sich diese Methodik aber als ungeeignet.

Nicht nur, daß mit einer Perifusionsmethode auch solche Effekte unterschieden werden können, für die die statische Messung zu unsensibel ist (z.B. Unterschied zwischen Glucose 0 mM und Glucose 3 mM, siehe Abb. 17) oder Effekte, die nur kurzzeitig auftreten (z.B. Alloxan, vgl. Henquin et al., 1979 und Idahl et al., 1977, 3.4.4), sichtbar gemacht werden können; weitere Vorteile dieser dynamischen Meßmethode liegen auf der Hand:

1. Allgemein besitzt eine solche Perifusionsmethode gegenüber einer statischen Messung den Vorteil, daß eine Anreicherung des von den Langerhansschen Inseln sezernierten Insulins durch ständigen Mediumsfluß verhindert wird und damit evtl. auftretende Rückkopplungsmechanismen vermieden werden.

   Diese feed-back-Reaktion würde allerdings bei Betrachtung des 86-Rubidiumeffluxes aus Langerhansschen Inseln wegen des kur-

zen betrachteten Effluxzeitraumes (10 min) auch bei Statikmessungen nicht ins Gewicht fallen, müßte aber bei längeren Inkubationszeiten berücksichtigt werden.

2. Dadurch, daß die verwendete Perifusionsapparatur ein geschlossenes System darstellt und nur beim Einlesen der mit 86-Rubidium beladenen Inseln sowie nach Beendigung der Perifusion ein kurzer direkter Kontakt mit dem radioaktiven Material besteht, ist die Kontaminationsgefahr gegenüber der statischen Methode sehr stark verringert, da hier Waschungen, Ablösen des Netzes vom Röhrchen, Abdekantieren des Netzes usw. Vorgänge darstellen, bei denen leicht Kontaminationen auftreten können.

3. Die statische Messung liefert als Ergebnis nur eine Aussage darüber, was sich innerhalb eines gewählten Effluxzeitraumes hinsichtlich des 86-Rubidiumeffluxes getan hat, läßt aber keinen Schluß darüber zu, ob dieser Efflux aus den Langerhansschen Inseln während der gesamten betrachteten Zeitspanne gleichförmig verlaufen ist.
Die Perifusionsmethode dagegen gibt Auskunft über jeweils momentane Änderungen des Rubidiumeffluxes (Kinetik) während der Perifusionsdauer und erlaubt daneben eine Aussage über die Geschwindigkeit des Wirkungseintrittes zugesetzter Substanzen, liefert also 1. quantitativ mehr Aussagen und 2. auch - qualitativ gesehen - zusätzliche Angaben.
Niemals hätten Effekte, wie z.B. die in Abb. 24 und 25 dargestellten Gegenregulationsvorgänge, mit Hilfe einer statischen Meßanordnung erkannt werden können.

4. Mit der Statikmethode kann pro Inselgruppe (d.h., wie in dieser Arbeit verwendet, 20 Langerhanssche Inseln) die Wirkung nur einer Substanz gemessen werden, wohingegen es die Perifusionsmethode ermöglicht, mehrere Substanzen oder verschiedene Konzentrationen einer Substanz (auch Substanz und Vergleich) am selben Inselkollektiv (hier 40 Langerhanssche Inseln) auszutesten.
Auch die Frage der Reversibilität eines erzielten Effektes kann ausschließlich mit Hilfe der Perifusionsmethodik geklärt werden.

5. Ein weiterer, sehr wichtiger Vorteil der Perifusion gegenüber der statischen Messung ist der, daß die Aussage über die Effluxrate unabhängig von der in den Versuch eingebrachten Anzahl Langerhansscher Inseln, auch deren Größe, d.h. auch 86-Rubidiumgehalt zu Beginn der Perifusion, ist, wohingegen das Ergebnis der statischen Messung, wieviel 86-Rubidium während des Effluxzeitraumes aus der Inselgruppe herausgeflossen ist, sehr wohl vom Beladungszustand eines Inselkollektivs, d.h. von Größe und Anzahl der Inseln, abhängt (siehe Innen- und Außenmessung 3.4.1, 3.4.2).

6. Durch die aus einem Perifusionsversuch, d.h. von einem Inselkollektiv aus 40 Langerhansschen Inseln, gewonnene Vielzahl von Daten und bedingt durch die gute Reproduzierbarkeit der mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse ist insgesamt gesehen eine geringere Versuchsanzahl notwendig, und damit

muß auch weniger Inselmaterial eingesetzt werden, um zu einer Aussage kommen zu können. Daher erweist sich diese Methode gegenüber der statischen Messung zusätzlich als kosten- und auch zeitsparend.

4.3 Einfluß von Glucose auf die Kaliumpermeabilität Langerhansscher Inseln

Wie von anderen Autoren (Henquin, 1980; Carpinelli und Malaisse, 1981) bereits beschrieben, so konnte auch mit der im Rahmen dieser Arbeit hier neu eingeführten Methodik in einer klaren Dosis-Wirkungs-Beziehung nachgewiesen werden, daß der maximale Hemmeffekt von Glucose auf die Kaliumpermeabilität der Langerhansschen Insel in einem Bereich nur wenig oberhalb von 5,6 mM anzusiedeln ist (3.5.1):
Durch Zusatz von Glucose 11,2 mM (Abb. 24) wird zwar initial der 86-Rubidiumefflux aus Langerhansschen Inseln stärker gehemmt als durch Glucose 5,6 mM (Abb. 23), sofort nach Erreichen des Maximaleffektes aber wird dieser gegenreguliert, und es tritt eine Erhöhung der Kaliumpermeabilität ein.
Die festgestellte Verminderung der 86-Rubidiumeffluxrate durch Glucose 11,2 mM ist trotz Gegenregulation größer als die durch Glucose 5,6 mM hervorgerufene Hemmung des 86-Rubidiumeffluxes ($Q = 0.4423$ für Glucose 11,2 mM, und $Q = 0.487$ für Glucose 5,6 mM), d.h., daß der Endpunkt der Kaliumeffluxhemmung noch nicht bei einer Glucosekonzentration von 5,6 mM erreicht sein kann, denn Glucose 11,2 mM üben trotz Gegenregulation einen stärkeren

Hemmeffekt aus. Der Endpunkt der Hemmung kann aber auch nicht erst bei einer Glucosekonzentration von 11,2 mM anzusiedeln sein, da hier bereits eine starke Gegenbewegung, d.h. starke Kaliumpermeabilitätserhöhung, festgestellt werden kann.
Auch in Abb. 23 (Glucose 5,6 mM) kann in der 4. - 6. Fraktion nach dem Umschalten (Phase 2) eine minimale - rechnerisch nicht unterscheidbare - Aufwärtstendenz festgestellt werden, d.h., daß mit einer Glucosekonzentration von 5,6 mM nahezu die Schwellenkonzentration erreicht wird, oberhalb derer auch andere Ionenbewegungen angeregt werden, die ihrerseits wiederum einen Einfluß auf den Kaliumefflux aus Langerhansschen Inseln ausüben.
Glucose 16,7 mM (Abb. 25) hemmen den 86-Rubidiumefflux aus Langerhansschen Inseln initial ebenfalls stärker als Glucose 5,6 mM, dieser Effekt wird aber - ebensowie bei Glucose 11,2 mM gesehen - gegenreguliert, wobei festzustellen ist, daß das Ausmaß der nun eintretenden Kaliumpermeabilitätserhöhung von der Glucosekonzentration abhängig ist, d.h., daß nach Zusatz von Glucose 16,7 mM eine stärkere 86-Rubidiumeffluxratenerhöhung festgestellt werden kann (Q = 0.5494) als bei Glucose 11,2 mM (Q = 0.4423) und damit insgesamt eine geringere Hemmung der Kaliumpermeabilität durch Glucose 16,7 mM resultiert als dies bei Glucose 11,2 mM und sogar bei Glucose 5,6 mM (Q = 0.487) beobachtet werden kann.
Es kann deshalb festgehalten werden, daß Glucose - wie dies auch von Carpinelli und Malaisse, 1981 dargelegt wurde - einen dualistischen Effekt auf die Kaliumpermeabilität Langerhansscher Inseln ausübt:

1. Eine dosisabhängige Verminderung der Kaliumpermeabilität bis hin zu einer Schwellenkonzentration von etwas > 5,6 mM Glucose.
2. Eine dosisabhängige Erhöhung der Kaliumpermeabilität für Glucosekonzentrationen oberhalb dieses Schwellenwertes.

Wie von Lebrun et al., 1982 und auch - wie in Abb. 34 und 35 zu sehen ist - in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, ist die Erhöhung der Kaliumpermeabilität, die bei Zusatz von Glucosekonzentrationen, die den Schwellenwert überschreiten, oder auch durch weitere Erhöhung der Glucosekonzentration von diesem Schwellenwert aus erzielt wird, an die Anwesenheit von Calciumionen im Medium gebunden.
Dieser Gegenregulationsmechanismus, der nicht von allen Autoren, die sich mit dem 86-Rubidiumefflux aus Langerhansschen Inseln beschäftigen, gefunden wird (Henquin et al., 1979; Malaisse et al., 1978), stimmt - zeitlich gesehen - genau mit den Vorgängen der Calciumionenfluxe überein, die u.a. von Malaisse und Mitarbeitern, 1981 beschrieben worden sind:
Vorausgeschickt sei, daß die auftretenden Veränderungen des Calciumeffluxes den Calciumeinstrom in die ß-Zelle widerspiegeln, wobei man sich hier einen Ca-Ca-Austausch vorzustellen hat (Herchuelz und Malaisse, 1980).
Bei Erhöhung der Glucosekonzentration von 0 mM auf 16,7 mM können verschiedene Phasen des Calciumeffluxes aus Langerhansschen Inseln unterschieden werden:
Schnell tritt eine initiale Hemmung des Calciumeffluxes ein,

die dann in eine starke Erhöhung der Calciumeffluxrate mündet, die - zuerst überschießend - sich dann auf einen etwas niedrigeren Wert einpendelt und stabilisiert (Malaisse et al., 1981; 1.1.2, 6.).

Genau dasselbe Bild erhält man auch bei Betrachtung des 86-Rubidiumeffluxes:

Bei Zusatz von z.B. Glucose 16,7 mM (Abb. 25) erkennt man zuerst eine maximale Hemmung, die mit der frühen Hemmung des Calciumeffluxes zeitgleich verläuft, sodann eine leicht überschießende Gegenregulation und schließlich auch hier ein Einpendeln auf einen stabilen Level, dessen Höhe je nach zugesetzter Glucosekonzentration variiert (Abb. 24, 25).

Das bedeutet auf den Calciuminflux übertragen:

1. Die Hemmung der Kaliumpermeabilität geht zeitlich gesehen - man kann auch sagen: ist Voraussetzung für - einer Calciumaufnahme durch spannungsabhängige Calciumkanäle voraus (Phase der Kalium- und Calciumeffluxhemmung).
   Erst wenn der Maximaleffekt der 86-Rubidiumeffluxratenminderung erreicht ist, kommt es zur Öffnung der spannungsabhängigen Calciumkanäle, somit zum verstärkten Influx von Calciumionen in das Zellinnere.
2. Zunächst kann eine massive Calciumaufnahme festgestellt werden, die ihrerseits zu einem verstärkten Calciumefflux führt (Ca-Ca-Exchange), gleichzeitig aber den Kaliumefflux aus der ß-Zelle aktiviert (= calciumsensitiver Kaliumefflux).
   Im Bild des Rubidium- bzw. des Calciumeffluxes wäre dies die Phase der überschießenden Gegenregulation, d.h. Rubi-

dium- bzw. Calciumeffluxratenerhöhung.
Es wird heute dieser zuerst auftretende massive Calciumioneneinstrom in die Zelle mit dem 1. Peak der biphasischen Insulinsekretion korreliert (Malaisse et al., 1981).
3. Nach dieser überschießenden Reaktion pendelt sich die Calciumaufnahme und damit der Calcium-Calcium-Exchange auf einen etwas niedrigeren, stabilen Wert ein und - dadurch bedingt - findet man wiederum, da calciumsensitiv, einen Abfall der 86-Rubidiumeffluxrate auf einen stabilen Level.

Der Vorgang der Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel und damit auch der Calciumefflux sowie auch der calciumsensitive Rubidiumefflux sind von der Glucosekonzentration abhängig.
Je höher diese ist, desto größer das Ausmaß des Calciuminfluxes, desto höher die Calciumeffluxrate und desto größer die calciumsensitive Kaliumpermeabilität der ß-Zelle (Abb. 24 und 25).
Ein erhöhter Calciuminflux aber bedeutet eine erhöhte Insulinsekretion.

Geht man von einem - bezüglich der Kaliumpermeabilität - bereits nahezu maximal gehemmten System aus (Glucose 5,6 mM in Phase 1, Abb. 34), so entfällt die Phase der Verminderung der 86-Rubidiumeffluxrate, und es tritt sofort eine massive Erhöhung der Kaliumpermeabilität ein (= massiver Calciumioneneinstrom), sodann eine Verminderung der Effluxrate auf einen stabilen Wert.

Entfernt man aber die Calciumionen aus dem Medium, so kommt es nach Zusatz von Glucose 16,7 mM zu einem bereits mit Glucose 5,6 mM gehemmten System zu einer nochmaligen Steigerung der Kaliumpermeabilitätshemmung, da ja hier eine Gegenregulation, d.h. also ein calciumsensitiver Rubidiumefflux, nicht auftreten kann (Abb. 35).

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich, daß mit dem Modell der 86-Rubidiumeffluxratenmessung durchaus auch Calciumionenbewegungen sichtbar gemacht werden können, da in einem Bereich von Glucose > 5,6 mM die Kaliumpermeabilität durch Calciumionen mitreguliert wird (= calciumsensitiver Kaliumefflux).

4.4 Redoxsystem der ß-Zelle und seine Bedeutung für die Kaliumpermeabilität

Daß den reduzierten Pyridinnukleotiden NADH bzw. NADPH die Vermittlerrolle zwischen metabolischen Ereignissen und Zellmembranveränderungen, d.h. Ionenfluxen, innerhalb des 'Stimulus-secretion coupling' zukommt, wird heute allgemein angenommen. Dabei wird eine Verschiebung des NADPH/NADP-Quotienten zur reduzierten Seite hin als auslösender Faktor dafür angesehen, daß eine Verminderung der Kaliumpermeabilität eintritt (Ashcroft, 1980, review).
Die Rolle der Pyridinnukleotide wird, wie auch schon in der Einleitung dargelegt, durch mehrere Befunde bestätigt:

1. Reduzierte Pyridinnukleotide entstehen aus dem Glucosemetabolismus, und diese Verstoffwechselung ist sowohl Voraussetzung für die Auslösung der Insulinsekretion (Hedeskov, 1980) als auch für die Änderung der Kaliumpermeabilität der ß-Zelle (Henquin, 1980a).
Wird der Glucosemetabolismus in der ß-Zelle gehemmt, so kann weder die Ausbildung eines Aktionspotentiales (Dean et al., 1975) noch eine Verminderung der Kaliumpermeabilität (Henquin, 1980a) oder eine Insulinsekretion festgestellt werden (Ashcroft et al., 1973; Ashcroft und Randle, 1975).

2. Nur metabolisierbare Kohlenhydrate, bei deren Abbau in der ß-Zelle also reduzierte Pyridinnukleotide bereitgestellt werden, lösen einerseits eine Insulinsekretion aus (Ashcroft et al., 1972, 1973; Hellman et al., 1973), andererseits sind nur diese Kohlenhydrate auch in der Lage, eine Änderung der Kaliumpermeabilität (Henquin, 1980) und des Membranpotentials der ß-Zelle zu bewirken (Dean et al., 1975), nicht aber solche Kohlenhydrate, die keinem Metabolismus unterliegen.

3. Oxidation der Pyridinnukleotide oder allgemeiner: Verminderung der Reduktionsäquivalente der ß-Zelle hat eine Erhöhung der Kaliumpermeabilität sowie eine Verminderung der glucoseinduzierten Insulinsekretion zur Folge:
So führen Stoffe wie tertiäres Butylhydroperoxid 2 mM oder Methylenblau 0,5 µg/ml, Substanzen, die den intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten senken (Ammon et al., 1979), zu einer Vergrößerung der 86-Rubidiumeffluxrate (Henquin, 1980a) und

zu einer Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion (Ammon et al., 1979).

Allerdings muß bei diesen beiden Substanzen berücksichtigt werden, daß auch andere Parameter der Zelle, wie z.B. ATP-Gehalt, beeinträchtigt werden.

Ein weiterer Stoff, der in der Lage ist, den intrazellulären GSH-Pool durch Oxidation zu vermindern, ohne allerdings den ATP-Gehalt der Zelle zu beeinflussen, ist das Diazodicarbonsäure-bis-(N-methylpiperazid), (DIP), - ein Azoester (Ammon et al., 1983).

Hier kann ebenfalls eine Erhöhung (wenn auch quantitativ geringer als bei den beiden vorangehend besprochenenen Substanzen) der Kaliumpermeabilität (Wahl, 1983), eine dosisabhängige Verminderung der 45-Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel sowie eine Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion bereits in Konzentrationen von 0,025 - 0,1 mM festgestellt werden (Ammon et al., 1983).

4. Auf der anderen Seite führt eine Reduktion der Pyridinnukleotide in der Langerhansschen Insel durch Stoffe, wie z.B. Pentobarbital, zu einer Hemmung der Kaliumpermeabilität (Henquin, 1980a).

All diesen Befunden, die für eine wichtige Funktion der reduzierten Pyridinnukleotide zwischen Metabolismus und Ionenereignissen sprechen, steht die Beobachtung entgegen, daß in dem Bereich, in dem Glucose eine Auswirkung auf die Kaliumpermeabilität der ß-Zelle besitzt, d.h. in einem Bereich zwischen 0 mM

und 5,6 mM, sowohl der NADPH/NADP-Quotient als auch der GSH/GSSG-Quotient nur in sehr geringem Umfang gesteigert werden. Erst oberhalb dieses Schwellenwertes, d.h. in einem Bereich, wo bereits maximale Hemmung der Kaliumpermeabilität festgestellt werden kann, findet man auch einen starken Anstieg des NADPH-Gehaltes der Langerhansschen Insel als auch eine starke Zunahme des intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten (Malaisse et al., 1979; Ammon et al., 1980).
Es kann deshalb vermutet werden, daß die Vermittlerrolle zwischen Glucosemetabolismus und Membranereignissen, d.h. Kaliumpermeabilitätsveränderung, nicht die alleinige Aufgabe der Reduktionsäquivalente darstellt, sondern daß diese auch noch zu einem späteren Zeitpunkt die Ereignisse innerhalb des 'Stimulus-secretion coupling' beeinflussen.

4.4.1 Streptozocin

Wie den Abbildungen 28, 29 und 30 und den Werten aus Tabelle VIII entnommen werden kann, ist Streptozocin in der Lage, dosisabhängig die durch Glucose 5,6 mM hervorgerufene Kaliumpermeabilitätshemmung zu vermindern. Der Effekt dieser Substanz setzt sehr rasch ein und ist ebenso schnell nach Absetzen reversibel.
Die Wirkung von Streptozocin auf die ß-Zelle ist vielschichtig: Streptozocin wirkt als Radikalbildner und mindert einerseits direkt den Gehalt der Zelle an Reduktionsäquivalenten wie NADPH und GSH (Robbins et al., 1980; Ammon, unveröffentlicht), da zum

Neutralisieren bzw. Abfangen von Radikalen bzw. daraus zusammen mit z.B. Lipiden der Zellmembran entstehenden Peroxiden reduzierte Gruppen notwendig sind.

Zum anderen wird durch diese Radikalbildung die Zell-DNA so geschädigt, daß eine Steigerung der poly(ADP-ribose)synthetase-Aktivität, ein NAD abbauendes Enzym, resultiert (Okamoto, 1981) Auch wird der ATP-Gehalt der ß-Zelle stark beeinträchtigt und auch gleichzeitig der Glucosemetabolismus gehemmt (Hinz und Pfeiffer, 1974).

Es scheint aber bei der Vermittlung der Wirkung von Streptozocin dem Redoxsystem der ß-Zelle eine besondere Bedeutung zuzukommen, da durch 'Unterstützung' dieses Systems durch vorherige Gabe von Superoxiddismutase, einem radikalfangenden Enzym, oder Zusatz des als Antioxidans wirkenden Vitamin E die diabetogene Wirkung von Streptozocin abgeschwächt werden kann (Robbins et al., 1980; Slonim et al., 1977).

Zwar kann durch vorherige Gabe von GSH die Streptozocinwirkung nicht beeinträchtigt werden (Hoftietzer, 1975), es muß allerdings berücksichtigt werden, daß exogen zugesetztes GSH nicht in der Lage ist, in die ß-Zelle einzudringen, und somit auch kein intrazellulärer antioxidativer Effekt mit dieser Substanz erzielt werden kann (Flohe et al., 1974).

Es kann also festgestellt werden, daß Streptozocin wohl über eine Verminderung der Reduktionsäquivalente die Kaliumpermeabilität der ß-Zelle erhöht; somit wird die Ausbildung eines Aktionspotentiales unterbunden, es erfolgt keine Öffnung der spannungsabhängigen Calciumkanäle, und in Folge kann eine Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion beobachtet werden (Golden et al., 1971).

Diese in der vorliegenden Arbeit festgestellte 86-Rubidiumefluxratenerhöhung durch Streptozocin ist sofort nach Absetzen der Substanz vollständig reversibel, was aber bedeutet, daß hier durch die verwendeten Dosen von Streptozocin keine irreversible Schädigung der ß-Zelle innerhalb des beobachteten Zeitraumes hervorgerufen worden sein kann, sondern lediglich eine vorübergehende Hemmung des Sekretionsmechanismuses von Insulin durch Eingriff in das Redoxsystem der ß-Zelle bewirkt wurde.

Es muß daher bei Betrachtung des Effektes von Streptozocin auf das endokrine Pankreas unterschieden werden zwischen der Sofortwirkung (= Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion) und dem Langzeiteffekt, d.h. die in vivo nach einer Zeitdauer von ca. 24 Stunden sich manifestierende diabetische Stoffwechsellage, die mit einer irreversiblen Schädigung bzw. Zerstörung der Langerhansschen Inseln einhergeht.

Wie bereits in der Einleitung dargelegt, kann dieser Langzeiteffekt von Streptozocin durch Gabe von NAD bis zu 2 Stunden nach Zusatz der diabetogenen Substanz in vitro wie auch in vivo beeinflußt werden (Schein und Loftus, 1968).

4.4.2 Exogenes Insulin

Mit den Abbildungen 31, 32 und 33 sowie den Werten in Tabelle IX kann gezeigt werden, daß exogenes Insulin in einer Konzentration von 200 µE/ml bzw. 800 µE/ml keine Vergrößerung des

durch Glucose 5,6 mM gehemmten 86-Rubidiumeffluxes aus Langerhansschen Inseln hervorruft, obwohl

1. eine Verminderung des Glucosemetabolismus über den Pentosephosphatweg (Ammon und Verspohl, 1976),
2. eine Verminderung der Reduktionsäquivalente NADPH und GSH der ß-Zelle (Ammon et al., 1980),
3. eine Verminderung der glucoseinduzierten 45-Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel (Ammon, unveröffentlicht),
4. eine Verminderung der glucoseinduzierten Insulinsekretion (Ammon und Verspohl, 1976; Verspohl et al., 1982)

durch exogenes Insulin bereits festgestellt werden konnte.

Diese auf den ersten Blick als Widerspruch erscheinende Befunde lassen sich dadurch erklären, daß

1. wie oben dargelegt, für die Änderung der Kaliumpermeabilität nur der Konzentrationsbereich von 0 mM bis ca. 5,6 mM Glucose verantwortlich ist.
2. exogen zugesetztes Insulin aber den GSH-Pool der Zelle bei einer Glucosekonzentration von 5,6 mM nur sehr wenig vermindert; weitaus stärker wird der GSH-Gehalt der ß-Zelle erst bei einer Glucosekonzentration von 16,7 mM herabgesetzt (Ammon et al., 1980). Dieselbe Beobachtung wurde auch für den NADPH-Gehalt der ß-Zelle gemacht (Ammon und Verspohl, 1976).

Daraus kann gefolgert werden, daß exogenes Insulin nicht die für die Vermittlerrolle zwischen Glucosemetabolismus und Mem-

branereignissen verantwortlichen Reduktionsäquivalente vermindert, sondern der Wirkort von Insulin innerhalb des 'Stimulus-secretion coupling' an einem nach Änderung der Kaliumpermeabilität liegenden Teilschritt angesiedelt werden muß.
Es liegt daher wiederum (s.o.) die Vermutung nahe, daß es außer der Kaliumpermeabilitätsänderung mindestens einen weiteren Schritt innerhalb des Sekretionsmechanismusses von Insulin geben muß, der durch Reduktionsäquivalente bzw. Thiole beeinflußt werden kann.

Wie in Abb. 34-37 und den Werten in Tabelle X zu sehen, konnte im Rahmen dieser Arbeit mit dem Modell der 86-Rubidiumefflux-messung aus Langerhansschen Inseln eine Beziehung zwischen Kalium- und Calciumfluxen hergestellt sowie nachgewiesen werden, daß exogenes Insulin 200 µE/ml bzw. 800 µE/ml einen Einfluß auf den calciumsensitiven Kaliumefflux besitzt - der in einem Bereich von Glucose > 5,6 mM zu beobachten ist - und zwar derart, daß dieser calciumsensitive Kaliumefflux dosisabhängig durch Insulin vermindert wird.
Diese Beobachtung ist aber gleichbedeutend mit der Tatsache, daß durch exogenes Insulin 200 µE/ml bzw. 800 µE/ml die Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel vermindert wird.
Mit der Untersuchung der glucoseinduzierten 45-Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel in Anwesenheit von exogenem Insulin konnte dieser Befund bestätigt werden (Ammon, unveröffentlicht).

Für die Rolle der Thiole bedeutet dies aber, daß sie mindestens

2 Funktionen innerhalb des 'Stimulus-secretion coupling' besitzen, und zwar kommt ihnen neben der oben besprochenen Vermittlerrolle zwischen metabolischen Vorgängen und Kaliumfluxen (dies in einem Glucosekonzentrationsbereich unterhalb 5,6 mM) eine regulatorische Funktion bei der Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel zu; sie sind damit direkt an der Regulation der sezernierten Insulinmenge beteiligt.
Man kann sich dies so vorstellen, daß intrazelluläre Thiole mit membranständigen Thiolen in Verbindung stehen, die dann ihrerseits den Öffnungszustand von Calciumkanälen regulieren.
Die Beziehung zwischen intrazellulären und membranständigen Thiolgruppen wird von mehreren Autoren bestätigt (Rink, 1974; Haest et al., 1979; Ammon et al., 1983).
Da Calciumionen erst oberhalb einer Konzentration von 5,6 mM Glucose aktiv in die ß-Zelle aufgenommen werden (Hellman et al., 1976), kommt dieser Funktion der Thiole erst oberhalb dieses Schwellenwertes eine Bedeutung innerhalb des Vorgangs der glucoseinduzierten Insulinsekretion zu.

Stoffe, die wie Streptozocin oder tertiäres Butylhydroperoxid bzw. Methylenblau als Oxidantien wirken, beeinträchtigen beide Funktionen der Thiole bzw. Reduktionsäquivalente. Diese Substanzen sind auch in der Lage, die 'Grundausstattung' der Zelle an Reduktionsäquivalenten zu oxidieren, d.h. die bei normalen Blutzuckerkonzentrationen in der ß-Zelle vorhandenen Reduktionsäquivalente; daher kann mit diesen pharmakologischen Hilfsstoffen auch eine Erhöhung der Kaliumpermeabilität erzielt werden.

So senkt z.B. Streptozocin - in Dosen gleicher Größenordnung wie in der vorliegenden Arbeit verwendet - den NADPH-Gehalt der Langerhansschen Insel sowohl in Anwesenheit von Glucose 16,7 mM als auch von Glucose 3 mM (Ammon, unveröffentlicht).
Exogenes Insulin aber, das als physiologischer Inhibitor der Insulinsekretion wirkt, beeinflußt die 'Grundausstattung' der Zelle an NADPH und Thiolen nicht bzw. nur sehr geringfügig, sodaß die ß-Zelle trotz Anwesenheit von Insulin in der Lage ist, auf Glucosereiz hin mit einer Hemmung der Kaliumpermeabilität zu reagieren.
Exogenes Insulin entfaltet seine Wirkung - was auch physiologisch sinnvoller erscheint - an einem Teilschritt der Sekretionskaskade, der über die Menge des sezernierten Insulins entscheidet, am Schritt der Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel, deren Ausmaß mit der Menge an sezerniertem Insulin direkt korrelierbar ist.
Auf elektrophysiologische Vorgänge übertragen, bedeutet dies, daß exogenes Insulin es zuläßt, daß auf Stimulusreiz hin die Zellmembran depolarisiert, ein Aktionspotential zustandekommt, die Anwesenheit von exogenem Insulin aber darüber entscheidet, wie lange die Zelle in diesem depolarisierten Zustand verbleibt, d.h. exogenes Insulin bestimmt die Burstlänge (1.1.2).

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Befunde läßt sich die Wirkung von Glucose auf den Stoffwechsel der ß-Zelle folgendermaßen zusammenfassen:
Glucose wird in der ß-Zelle metabolisiert, woraus eine Verschiebung des Redoxgleichgewichtes in der ß-Zelle zur reduzierten Seite hin resultiert.

Während eine Glucosekonzentrationserhöhung von 0 mM auf ca. 5,6 mM den NADPH/NADP- bzw. GSH/GSSG-Quotienten der ß-Zelle nur in geringem Umfang steigert, erfolgt bei weiterer Erhöhung der Glucosemenge ein starker Anstieg des NADPH- sowie des GSH-Gehaltes der Zelle.

Die geringe Veränderung des NADPH/NADP- und GSH/GSSG-Quotienten bis zu einer Glucosekonzentration von ca. 5,6 mM ist ausreichend für eine maximale Hemmung der Kaliumpermeabilität der ß-Zelle, d.h. eine Veränderung des Ruhepotentials bis hin zum Schwellenpotential, nach dessen Erreichen die Membran depolarisiert und spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet werden, sodaß Calciumionen in die ß-Zelle einströmen können.

Weitere Erhöhung der Glucosekonzentration führt nicht zu einer stärkeren Hemmung der Kaliumpermeabilität.

Durch Zusatz stimulatorischer Glucosemengen (> 5,6 mM) kann eine starke Erhöhung sowohl des NADPH/NADP- als auch des GSH/GSSG-Quotienten beobachtet werden. Diese Reduktionsäquivalente stehen mit membranständigen Thiolen in Verbindung, die ihrerseits den Öffnungszustand von Calciumkanälen und damit die Menge an in die ß-Zelle einströmenden Calciums regulieren. Verstärkte Calciumaufnahme in die ß-Zelle bedeutet eine Steigerung der Insulinsekretion (Abbildung 38).

Neben diesen geschilderten Stoffwechselveränderungen spielen - wie in der Einleitung dargelegt - weitere Vorgänge in der ß-Zelle für den Anstieg an cytosolischem Calcium auf Glucosereiz hin eine Rolle (z.B. Phosphoenolpyruvat oder cAMP).

Streptozocin und andere Oxidantien führen zu einer Verminderung

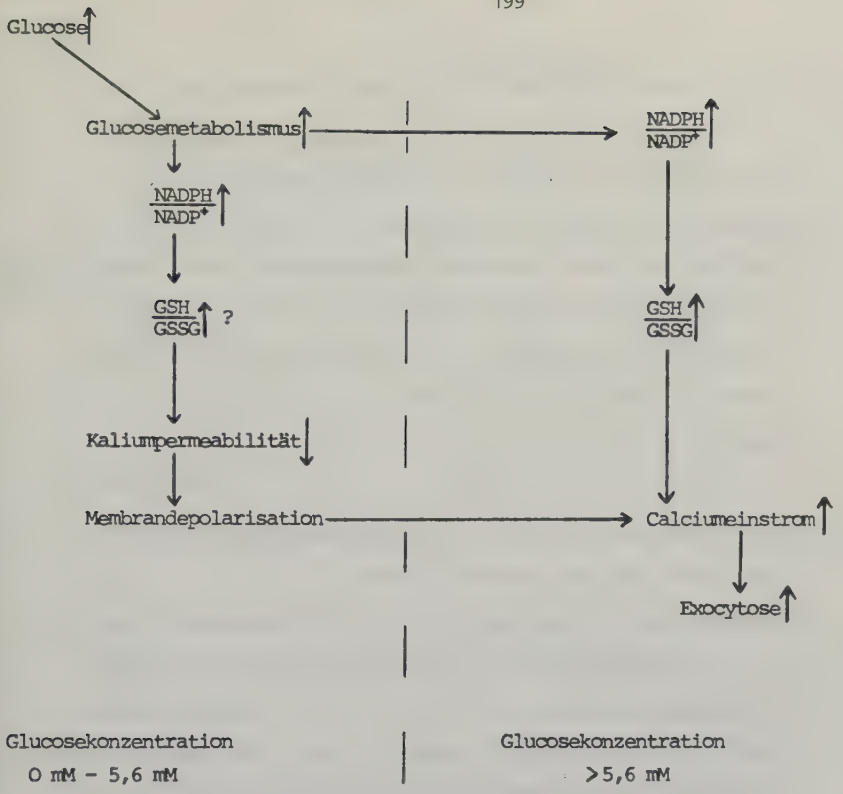


Abb. 38: 'Stimulus-secretion coupling'
Schematische Darstellung der Stoffwechseländerungen der ß-Zelle. Aufgrund der Befunde der vorliegenden Arbeit modifiziert, nach Ashcroft, 1980 (Vgl. Abb. 1).

Metabolisierung von Glucose in der ß-Zelle führt zu einer Verschiebung des Redoxgleichgewichtes zur reduzierten Seite hin, was

a) in einem Konzentrationsbereich von Glucose 0 mM - ca. 5,6 mM eine Verminderung der Kaliumpermeabilität der ß-Zelle zur Folge hat, und
b) bei Zusatz höherer Glucosekonzentrationen (>5,6 mM) keine weitere Hemmung der Kaliumpermeabilität, sondern hier einen erhöhten Calciumeinstrom in die Langerhanssche Insel bewirkt.

des NADPH/NADP- bzw. GSH/GSSG-Quotienten unabhängig von der Glucosekonzentration im Medium, wohingegen bei exogenem Insulin eine Verminderung des NADPH- und GSH-Gehaltes der ß-Zelle nur in Anwesenheit höherer Glucosemengen (> 5,6 mM) deutlich festzustellen ist. Diese unterschiedliche Auswirkung auf das Redoxsystem der ß-Zelle durch Streptozocin bzw. exogenes Insulin bedingt die unterschiedliche Lokalisation der Wirkorte der beiden Substanzen innerhalb des 'Stimulus-secretion coupling' (Abbildung 39).

Für die feed-back-Regulation seiner eigenen Sekretion durch Insulin ergibt sich nun folgendes Schema:
Exogenes Insulin hemmt, vermittelt über Rezeptorinteraktion an der Langerhansschen Insel, die Metabolisierung von Glucose über den Pentosephosphatweg, indem die Aktivität des Enzyms Glucose-6-phosphatdehydrogenase vermindert wird, was eine Abnahme des NADPH/NADP- sowie des GSH/GSSG-Quotienten zur Folge hat.
Diese Verminderung der intrazellulären Reduktionsäquivalente führt dazu, daß nun membranständige Thiole, die den Öffnungszustand von Calciumkanälen regulieren, nicht mehr in reduziertem Zustand gehalten werden können, woraus eine Hemmung der glucoseinduzierten Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel resultiert, gleichbedeutend mit einer Verminderung der glucoseinduzierten Insulinsekretion.
Dadurch, daß durch exogen zugesetztes Insulin erst in Anwesenheit höherer Glucosekonzentrationen (> 5,6 mM) der NADPH- bzw. GSH-Gehalt der ß-Zelle deutlich verringert wird, kann keine Auswirkung auf die Hemmung der Kaliumpermeabilität der ß-Zelle,

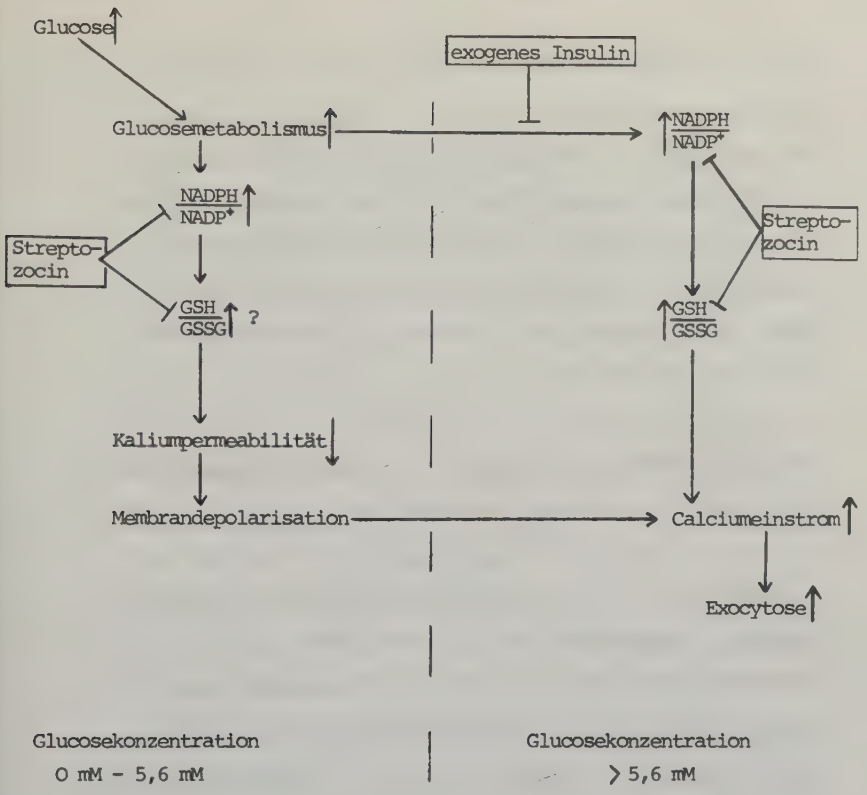


Abb. 39: 'Stimulus-secretion coupling'
Lokalisation der Wirkorte von Streptozocin und exogenem Insulin.

Streptozocin vermindert unabhängig von der Glucosekonzentration durch Oxidation den ß-Zellgehalt an Reduktionsäquivalenten und hemmt damit den Glucoseeffekt sowohl auf die Kaliumpermeabilität der ß-Zelle als auch auf die Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel.

Exogenes Insulin führt nur in Anwesenheit höherer Glucosemengen (> 5,6 mM) zur deutlichen Verminderung des NADPH/NADP- und des GSH/GSSG-Quotienten. Die glucoseinduzierte Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel wird durch exogenes Insulin gehemmt, wohingegen die durch Glucose 0 mM - ca. 5,6 mM hervorgerufene Hemmung der Kaliumpermeabilität der ß-Zelle nicht beeinflußt wird.

die durch Glucose in einem Bereich von 0 mM - 5,6 mM hervorgerufen wird, beobachtet werden.
Exogenes Insulin mindert damit nicht die Bereitschaft der ß-Zelle, Insulin zu sezernieren (eine Membrandepolarisation ist durchaus möglich), sondern reguliert die Insulinfreisetzung an einem Teilschritt des Sekretionsmechanismusses, der über die Menge an sezerniertem Insulin entscheidet (= Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel).

Mit diesem Modell der Doppelfunktion der Reduktionsäquivalente lassen sich weitere Beobachtungen erklären:

1. Durch GSH in einer physiologischen Konzentration von 0,1 mM wird die Kaliumpermeabilität der Langerhansschen Insel nicht beeinflußt (Wahl, 1983), wohl aber kann festgestellt werden, daß bei Zusatz von GSH 0,1 mM die 45-Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel gesteigert (Strölin und Ammon, 1983), sowie eine Erhöhung der glucoseinduzierten Insulinsekretion erzielt werden kann (Hellman et al., 1975a).
Zwar wurde von Henquin, 1980a eine Verminderung der 86-Rubidiumeffluxrate nach Zusatz von GSH festgestellt, jedoch wurde eine völlig unphysiologische Dosis von 10 mM, der evtl. intrazelluläre Wirkungen zukommen dürften, verwendet.
Die Wirkung von GSH, das in physiologischen Dosen praktisch nicht in die Zelle eindringen kann (Flohe et al., 1974), könnte so erklärt werden, daß exogen zugesetztes Glutathion die Wirkung von membranständigen Thiolgruppen, die den Öffnungszustand der Calciumkanäle regulieren, verstärkt und so die 45-Calciumaufnahme und folglich die Insulinsekretion steigert.

2. Obwohl durch para-Chlormercuribenzoat, eine organische Quecksilberverbindung, die in der Lage ist, mit membranständigen Thiolgruppen zu reagieren, aber nicht die Zellmembran zu permeieren vermag, keine Hemmung der Kaliumpermeabilität der Langerhansschen Insel beobachtet werden kann, wird durch diese Substanz die 45-Calciumaufnahme in die ß-Zelle gesteigert (Hellman et al., 1975).

Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß para-Chlormercuribenzoat mit membranständigen Thiolen, die über den Öffnungszustand der Calciumkanäle entscheiden, so reagiert, daß eine Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel erleichtert wird. Durch exogenes Insulin kann die Insulinsekretion, die auf para-Chlormercuribenzoat-Reiz zustandekommt, vermindert werden (Ammon et al., 1980).

Dadurch, daß exogenes Insulin den intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten herabsetzt, können nun Membranthiole nicht mehr in reduziertem Zustand gehalten werden, die Reaktionsmöglichkeit für para-Chlormercuribenzoat ist herabgesetzt, woraus eine Abnahme der Insulinsekretion resultiert.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

5.1 Fragestellung

1. An isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte sollte die Frage untersucht werden, ob durch Streptozocin und exogenes Insulin - zwei Stoffen, von denen eine Beeinflussung des Redoxsystems der ß-Zelle bekannt ist - auch die Kaliumeffluxrate aus Langerhansschen Inseln verändert werden kann. Damit sollte geklärt werden, inwieweit eine Veränderung des Redoxzustandes der ß-Zelle eine Auswirkung auf die Kaliumpermeabilität besitzt.
In diesem Zusammenhang sollte weiterhin der Wirkort von exogenem Insulin auf seine eigene Sekretion innerhalb der Kaskade der Ereignisse von Glucosereiz bis zur Exocytose näher lokalisiert werden.

2. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung mußte eine Methodik zur Bestimmung des Kaliumeffluxes aus Langerhansschen Inseln eingeführt werden, in Anlehnung an eine von Sehlin und Täljedal, 1974 und von Ammon et al., 1983 beschriebene Inkubationsmethode. Da sich im Verlauf der Untersuchungen herausstellte, daß eine solche statische Methode für die Klärung der anstehenden Fragen nicht sensitiv genug war, mußte eine Perifusionsmethode, wie u.a. von Henquin, 1978 beschrieben, eingeführt werden.

5.2 Ergebnisse im methodischen Teil

1. Um den 86-Rubidiumefflux aus Langerhansschen Inseln betrachten zu können, mußte zunächst einmal eine Beladung der Langerhansschen Inseln mit 86-Rubidium bis zu einem steady-state-Gleichgewicht sichergestellt werden.
Dieser Gleichgewichtszustand konnte nur dann erreicht werden, wenn dem Inkubationsmedium Rinderserumalbumin zugesetzt war.

2. Es konnte bei Betrachtung des 86-Rubidiumeffluxes die anfangs angewandte Methodik so weit modifiziert werden (kombinierte Innen- und Außenmessung), daß in der Literatur beschriebene Effekte mit gleicher Genauigkeit verifiziert werden konnten.

3. Da sich für die zu betrachtenden Fragestellungen diese statische Methode aber als zu unsensibel erwies, wurde eine dynamische Meßmethode eingeführt.
Mit dieser Perifusionsmethode konnten Ergebnisse, wie sie von anderen Autoren bereits beschrieben waren, bestätigt werden.

5.3 Versuchsergebnisse

1. Glucose übt einen dualistischen Effekt auf die Kaliumpermeabilität Langerhansscher Inseln aus:
Bis zu einer Schwellenkonzentration von ca. 5,6 mM findet man eine dosisabhängige Verminderung der 86-Rubidiumeffluxrate.

Glucosekonzentrationen, die diesen Schwellenwert übersteigen, üben keine weitere Hemmung auf die Kaliumpermeabilität aus, sondern führen - wiederum dosisabhängig - zu einer Vergrößerung des Kaliumeffluxes aus Langerhansschen Inseln.

2. Diese Kaliumpermeabilitätserhöhung durch Glucosekonzentrationen oberhalb des Schwellenwertes von 5,6 mM wird direkt von der cytosolischen Calciumionenkonzentration reguliert. Nach Entfernen von Calciumionen aus dem Medium konnte ein solcher calciumsensitiver Kaliumefflux nicht mehr beobachtet werden, vielmehr wird dann bei Erhöhung der Glucosekonzentration über 5,6 mM hinaus die 86-Rubidiumeffluxrate weiter vermindert.

3. Die diabetogene Substanz Streptozocin, die den Gehalt der ß-Zelle an Reduktionsäquivalenten NADPH sowie GSH senkt, führte dosisabhängig zu einer Steigerung der Kaliumpermeabilität in Anwesenheit von Glucose 5,6 mM, ein Effekt, der nach Absetzen der Substanz reversibel war.

4. Bei Zusatz von exogenem Insulin, das ebenfalls den intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten senkt, dies aber nur bei hoher Glucosekonzentration (16,7 mM) deutlich wird, konnte keine Veränderung der Kaliumpermeabilität in Anwesenheit von Glucose 5,6 mM festgestellt werden.

5. Es konnte gezeigt werden, daß exogenes Insulin den calciumsensitiven Kaliumefflux aus Langerhansschen Inseln in Anwesenheit von Glucose 16,7 mM dosisabhängig hemmen kann.

5.4 Schlußfolgerungen

1. Kalium- bzw. Calciumfluxe besitzen unterschiedliche Aufgaben innerhalb des 'Stimulus-secretion coupling':

   1. Die Hemmung der Kaliumpermeabilität entscheidet, ob eine Insulinsekretion auf Glucosereiz hin stattfindet.

   2. Die Calciumfluxe, d.h. direkt die Menge an cytosolischem Calcium, regulieren die Menge an sezerniertem Insulin, sofern eine Hemmung der Kaliumpermeabilität vorausgegangen ist.

2. Dem Redoxsystem der ß-Zelle kommen innerhalb des Sekretionsmechanismusses mindestens 2 Funktionen zu:

   a) Reduktionsäquivalente, die bereits durch substimulatorische Glucosemengen gebildet werden, sind für die Vermittlung zwischen Glucosemetabolismus und Änderung der Kaliumpermeabilität verantwortlich (Bereich zwischen Glucose 0 mM und 5,6 mM).

   b) Darüberhinaus beeinflussen intrazelluläre Thiole, die mit Membranthiolen in Verbindung stehen, die Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel und modulieren so die Menge an sezerniertem Insulin.

3. Stoffe, die wie Streptozocin die 'Grundausstattung' der Zelle an Thiolen oxidieren, vergrößern die Kaliumpermeabilität der

ß-Zelle und hemmen somit die Ausbildung eines Aktionspotentials.

4. Stoffe, die wie exogenes Insulin nicht die 'Grundausstattung' an Thiolen beeinflussen, wohl aber den GSH/GSSG-Quotienten der Zelle in Anwesenheit höherer Glucosekonzentrationen mindern, verändern nicht die Kaliumpermeabilität der ß-Zelle, sondern führen zu einer Hemmung der Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Akthar, M.S., Verspohl, E., Hegner, D., Ammon, H.P.T. (1977)
6-Phosphogluconate/glucose-6-phosphate ratio in rat pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin.
Diabetes 26, 857-863

Ammon, H.P.T., Abdel-Hamid, M. (1981)
Potentiation of the insulin-releasing capacity of tolbutamide by thiols: Studies on the isolated perfused pancreas.
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 317, 262-267

Ammon, H.P.T., Akthar, M., Grimm, A., Niklas, H. (1979)
Effect of methylene blue and thiol oxidants on pancreatic islet GSH/GSSG ratios and tolbutamide mediated insulin release in vitro.
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 307, 91-96

Ammon, H.P.T., Grimm, A., Lutz, S., Wagner-Teschner, D., Händel, M., Hagenloh, I. (1980)
Islet glutathion and insulin release
Diabetes 29, 830-834

Ammon, H.P.T., Hägele, R., Youssif, N., Eujen, R., El-Amri, N. (1983)
A possible role of intracellular and membrane thiols of rat pancreatic islets in calcium uptake and insulin release.
Endocrinology 112, 720-726

Ammon, H.P.T., Verspohl, E. (1976)
Pyridine nucleotides in pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin.
Endocrinology 99, 1469-1476

Anderson, T., Schein, P.S., McMenamin, M.G., Cooney, D.A. (1974)
Streptozotocin diabetes.
Correlation with extent of depression of pancreatic islet nicotinamide adenine dinucleotide.
J. Clin. Invest. 54, 672-677

Arison, R.N., Feudale, E.L. (1967)
Induction of renal tumor by streptozotocin in rats.
Nature 214, 1254-1255

Ashcroft, S.J.H. (1980)
Glucoreceptor mechanisms and the control of insulin release and biosynthesis.
Diabetologia 18, 5-15

Ashcroft, S.J.H., Bassett, J.M., Randle, P.J. (1972)
Insulin secretion mechanisms and glucose metabolism in isolated islets.
Diabetes 21, Suppl. 2, 538-545

Ashcroft, S.J.H., Hedeskov, C.J., Randle, P.J. (1970)
Glucose metabolism in mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 118, 143-154

Ashcroft, S.J.H., Randle, P.J. (1970)
Enzymes of glucose metabolism in normal mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 119, 5-15

Ashcroft, S.J.H., Randle, P.J. (1975)
The pancreas and insulin release.
In: Diabetes. Its physiological and biochemical basis, edited by J. Vallance-Owen.
MTP Press, Lancaster, pp 31-62

Ashcroft, S.J.H., Weerasinghe, L.C.C., Bassett, J.M., Randle, P.J. (1972a)
The pentose cycle and insulin release in mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 126, 525-532

Ashcroft, S.J.H., Weerasinghe, L.C.C., Randle, P.J. (1973)
Interrelationship of islet metabolism adenosine triphosphate content and insulin release.
Biochem. J. 132, 223-231

Atwater, I., Ribalet, B., Rojas, E. (1978)
Cyclic changes in potential and resistance of the ß-cell membrane induced by glucose in islets of Langerhans from mouse.
J. Physiol. London 278, 117-139

Bannister, B. (1972)
The synthesis and biological activities of some analogs of streptozotocin.
J. of Antibiotics 25, 377-386

Berglund, O. (1981)
Disturbed fluxes of Rb (K) and Cl in islets of spontaneously diabetic mice (C57Bl/KsJ-db/db).
Acta biol. med. ger. 40, 23-30

Berne, C. (1975)
Nicotinamide adenine dinucleotide phoshateconverting enzymes and adenosine triphosphate citrate lyase in some tissues and organs of new zealand obese mice with special reference to the enzyme pattern of the pancreatic islets.
J. Histochem. Cytochem. 23, 660-665

Bonting, S.L. (1970)
Sodium-potassium activated adenosinetriphosphatase and cation transport.
In: Membranes and ion transport, ed. Bittar, E.E.
Wiley-Interscience, London pp 257-363

Boschero, A.C., Kawazu, S., Duncan, G., Malaisse, W.J. (1977)
Effect of glucose on K handling by pancreatic islets.
FEBS Letters 83, 151-154

Boschero, A.C., Malaisse, W.J. (1979)
Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXIX. Regulation of 86-Rb efflux from perifused islets.
Amer. J. Physiol. 236, E139-E146

Brosky, G., Logothetopoulos, J. (1969)
Streptozotocin diabetes in the mouse and guinea pig.
Diabetes 18, 606-611

Carpinelli, A.R., Malaisse, W.J. (1980)
Regulation of 86-Rb outflow from pancreatic islets. II.
Effect of changes in extracellular and intracellular pH.
Diabete & Metabolisme 6, 193-198

Carpinelli, A.R., Malaisse, W.J. (1980a)
Regulation of 86-Rb outflow from pancreatic islets. IV.
Effect of cyclic AMP, dibutyryl-cyclic AMP and theophyllin.
Acta diabet. Lat. 17, 199-205

Carpinelli, A.R., Malaisse, W.J. (1981)
Regulation of 86-Rb outflow from pancreatic islets: The dual effect of nutrient secretagogues.
J. Physiol. London 315, 143-156

Chang, A.Y., Noble, R.E., Wyse, B.M. (1977)
Streptozotocin-induced diabetes in the chinese hamster.
Biochemical and endocrine disorders.
Diabetologia 13, 595-602

Charles, S., Tamagawa, T., Henquin, J.C. (1982)
A single mechanism for the stimulation of insulin release and 86-Rb efflux from rat islets by cationic amino acids.
Biochem. J. 208, 301-308

Creutzfeldt, W., Frerichs, H., Creutzfeldt, C. (1969)
The stimulation and inhibition of insulin secretion in vivo and in vitro.
In: Diabetes, J. Ostman, editor
Excerpta medica foundation, publishers, Amsterdam 110

Crouch, R., Kimsey, G., Priest, D.G., Sarda, A., Buse, M.G. (1978)
Effect of streptozotocin on erythrocyte and retinal superoxide dismutase.
Diabetologia 15, 53-57

Dean, P.M., Matthews, E.K. (1970a)
Glucose-induced electrical activity in pancreatic islet cells.
J. Physiol. London 210, 255-264

Dean, P.M., Matthews, E.K. (1970b)
Electrical activity in pancreatic islet cells: Effect of ions.
J. Physiol. London 210, 265-275

Dean, P.M., Matthews, E.K. (1972)
The bioelectrical properties of pancreatic islet cells: Effect of diabetogenic agents.
Diabetologia 8, 173-178

Dean, P.M., Matthews, E.K., Sakamoto, Y. (1975)
Pancreatic islet cells: Effects of monosaccharides, glycolytic intermediates and metabolic inhibitors on membrane potential and electrical activity.
J. Physiol. London 246, 459-478

Evans, J.S., Gerritsen, G.C., Mann, K.M., Owen, S.P. (1965)
Antitumor and hyperglycemic activity of streptozotocin (NSC-37917) and its cofactor, U-15.774.
Cancer Chemother. Rep. 29, 91

Flohe, L., Benöhr, R.C., Siess, H., Waller, H.D., Wendel, A. (1974)
Glutathione. Proc. of the 16th conference of the german society of biological chemistry.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York pp 1-316

Frankel, B.J., Gylfe, E., Hellman, B., Idahl, L.-A., Landström, U., Lovtrup, S., Sehlin, J. (1978)
Metabolism of cold-stored pancreatic islets.
Diabetologia 15, 187-190

Freinkel, N., Younsi, C.E., Bonnar, J., Dawson, R.M. (1974)
Rapid transient efflux of phosphate ions from pancreatic islets as an early action of insulin secretagogues.
J. Clin. Invest. 54, 1179-1189

Frerichs, H., Reich, U., Creutzfeldt, W. (1965)
Insulinsekretion in vitro: I. Hemmung der glukose-induzierten Insulinabgabe durch Insulin.
Klin. Wschr. 43, 136-141

Golden, P., Baird, L., Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Walker, M.M. (1971)
Effect of streptozotocin on glucose-induced insulin secretion by isolated islets of Langerhans.
Diabetes 20, 513-518

Gunnarsson, R., Berne, C., Hellerström, C. (1974)
Cytotoxic effects of streptozotocin and N-nitrosomethylurea on the pancreatic B-cells with special regards to the role of nicotinamide adenine dinucleotide.
Biochem. J. 140, 487-494

Gwirtsman, H.E., Meltzer, H.L., Dunner, D.L., Fieve, R.R., Pierson Jr., R.N. (1980)
Rubidium replacement of total body potassium in Humans.
Hormone and Metabolic Research 12, 175

Hägele, R. (1981)
Dissertation, Tübingen

Haest, C.W.M., Kamp, D., Deuticke, B. (1979)
Formation of disulfide bonds between glutathione and membrane SH-groups in human erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta 557, 363-371

Hahn, H.-J., Ziegler, M., Jahr, H., Butter, R., Kohnert, K.D. (1976)
Investigations on isolated islets of Langerhans in vitro. XIII. Experiments concerning the preparation conditions with collagenase.
Endokrinologie 67, 67-78

Hanks, J.H., Wallace, E.R. (1949)
Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 196-200

Havu, N. (1969)
Sulfhydryl inhibitors and pancreatic islet tissue. Experiments with alloxan, iodoacetic acid, cobaltous chloride, cadmium chloride, sodium arsenite, and allyl isothiocyanate.
Acta Endocrin. Suppl. 139

Hedeskov, C.J. (1980)
Glucose-induced insulin secretion.
Physiol. Rev. 60, 442-509

Heinzl, S. (1979)
Dissertation, Tübingen

Hellerström, C., Gunnarsson, R. (1970)
Bioenergetics of islet function: oxygen utilization and oxidative metabolism in the ß-cells.
Acta diabet. Lat. 7, Suppl. 1, 127-158

Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1974)
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues. VIII. Comparisons of glucose with glyceraldehyde isomers and dihydroxyacetone.
Arch. Biochem. Biophys. 162, 448-457

Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1975a)
Stimulation of insulin release by thiols.
Biochim. Biophys. Acta 392, 101-109

Hellman, B., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B., Whistler, R.L. (1973)
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues. III. Effects of substituting sulphur for oxygen in the D-glucose molecule.
Biochem. Pharmacol. 22, 29-35

Hellman, B., Sehlin, J., Söderberg, M., Täljedal, I.-B. (1975)
The mechanism of action of chloromercurobenzene-p-sulfonic acid as insulin secretagogue: Fluxes of calcium, sodium, and rubidium in islets exposed to mercurial and a membrane-active antagonist.
J. Physiol. London 252, 701-712

Hellman, B., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1976)
Effects of glucose on 45-Ca uptake by pancreatic islets as studied with the lanthanum method.
J. Physiol. London 254, 639-656

Henquin, J.C. (1977)
Tetraethylammonium potentiation of insulin release and inhibition of rubidium efflux in pancreatic islets.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 77, 551-556

Henquin, J.C. (1978)
D-Glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islet cells.
Nature 271, 271-273

Henquin, J.C. (1979)
Opposite effects of intracellular Ca and glucose on K permeability of pancreatic islet cells.
Nature 280, 66-68

Henquin, J.C. (1980)
The potassium permeability of pancreatic islet cells: Mechanisms of control and influence on insulin release.
In: Biochemistry and biophysics of the pancreatic-B-cell. European workshop Brussels, 1979
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York pp 66-73

Henquin, J.C. (1980a)
Metabolic control of the potassium permeability in pancreatic islet cells.
Biochemical Journal 186, 541-550

Henquin, J.C. (1980b)
Tolbutamide stimulation and inhibition of insulin release: Studies of the underlying ionic mechanisms in isolated rat islets.
Diabetologia 18, 151-160

Henquin, J.C. (1981)
The effect of pH on 86-Rubidium efflux from pancreatic islet cells.
Mol. and Cell. Endocrin. 21, 119-128

Henquin, J.C., Malvaux, P., Lambert, A.E. (1979)
Alloxan-induced alteration of insulin release, rubidium efflux and glucose metabolism in rat islets stimulated by various secretagogues.
Diabetologia 16, 253-260

Henquin, J.C., Meissner, H.P. (1978)
Valinomycin inhibition of insulin release and alteration of the electrical properties of pancreatic B cells.
Biochim. Biophys. Acta 543, 455-464

Henquin, J.C., Meissner, H.P. (1982)
Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on 86-Rb fluxes and membrane potential in pancreatic B cells.
Biochem. Pharmacol. 31, 1407-1415

Herchuelz, A., Lebrun, P., Malaisse, W.J. (1980)
Calcium fluxes in the process of glucose-induced insulin release.
Arch. int. Pharmacodyn. 246, 173-174

Herchuelz, A., Malaisse, W.J. (1980)
Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets. Two calcium movement's dissociated response to glucose.
Amer. J. Physiol. 238, E87-E95

Herr, R.R., Elbe, T.E., Bergy, M.E., Jahnke, H.K. (1959)
Isolation and characterization of streptozotocin.
Antibiot. Ann. 1959-60, 226-240

Hinz, M., Katsilambros, N., Maier, V., Schatz, H., Pfeiffer, E.F. (1973)
Significance of streptozotocin induced nicotinamide adenine-dinucleotide (NAD) degradation in mouse pancreatic islets.
FEBS Letters 30, 225-228

Hinz, M., Pfeiffer, E.F. (1974)
The mechanism of streptozotocin action on mouse islets of Langerhans.
Diabetes 23, 373

Hodgkin, A.L. (1951)
The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle.
Biol. Rev. 26, 339-409

Hoftietzer, V. (1975)
Sci. Biol. J. 1, 35-36

Idahl, L.-A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1977)
Alloxan cytotoxicity in vitro.
Biochemical Journal 162, 9-18

Idahl, L.-A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B., Tamari-Rodriguez, J. (1978)
Effects of valinomycin on Rb fluxes, ATP content and insulin release in pancreatic islets.
Acta Endocrin. 88, 113-121

Iversen, J., Miles, D.W. (1971)
Evidence for a feedback inhibition of insulin on insulin secretion in the isolated perfused canine pancreas.
Diabetes 20, 1-9

Junod, A., Lambert, A.E., Orci, L., Pictet, R., Gonet, A.E., Renold, A.E. (1967)
Studies of the diabetogenic action of streptozotocin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 126, 201

Junod, A., Lambert, A.E., Stauffacher, W., Renold, A.E. (1969)
Diabetogenic action of streptozotocin: Relationship of dose to metabolic response.
J. Clin. Invest. 48, 2129-2139

Kallenberger, H.-M. (1980)
Dissertation, Tübingen

Karunanayake, E.H., Baker, J.R.J., Christian, R.A., Hearse, D.J., Mellows, G. (1976)
Autoradiographic study of the distribution and cellular uptake of 14-C-streptozotocin in the rat.
Diabetologia 12, 123-128

Kono, T., Robinson, F.W., Sarver, J.A. (1975)
Insulin-sensitive phosphodiesterase.
J. Biol. Chem. 250, 7826-7835

Lacy, P.E., Kostianovsky, M. (1967)
Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.
Diabetes 16, 35-39

Lazarus, S.S., Shapiro, S.H. (1973)
Influence of nicotinamide and pyridine nucleotides on streptozotocin and alloxan-induced pancreatic ß-cell cytotoxicity.
Diabetes 22, 499-506

Lebrun, P., Carpinelli, A.R., Herchuelz, A. (1981)
Paradoxical augmentation by glucose of 86-Rb outflow from pancreatic islets.
Diabetologia 21, 296

Lebrun, P., Malaisse, W.J., Herchuelz, A. (1982)
Paradoxical activation by glucose of quinine-sensitive potassium channels in the pancreatic B-cell.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 107, 350-356

Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1975)
The use of dispersed pancreatic islet cells in measurement of transmembrane transport.
Anal. Biochem. 63, 73-79

Lindström, P., Sehlin, J. (1982)
5-Hydroxytryptamine stimulates 86-Rb efflux from pancreatic ß-cells.
Biochim. Biophys. Acta 720, 400-404

Logothetopoulos, J., Davidson, J.K., Haist, R.E., Best, C.H. (1965)
Degranulation of beta cells and loss of pancreatic insulin after infusion of insulin antibody or glucose.
Diabetes 14, 493

Loreti, L., Dunbar, J.C., Chen, S., Foa, P.P. (1974)
The autoregulation of insulin secretion in the isolated pancreatic islets of lean (ob/ob) and obese-hyperglycemic (ob/ob) mice.
Diabetologia 10, 309-315

Malaisse, W.J., Boschero, A.C., Kawazu, S., Hutton, J.C. (1978)
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXVII. Effect of glucose on K-fluxes in isolated islets.
Pflügers Archiv 373, 237-242

Malaisse, W.J., Carpinelli, A.R., Sener, A. (1981)
Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Timing of early metabolic, ionic, and secretory events.
Metabolism 30, 527-532

Malaisse, W.J., Devis, G., Pipeleers, D.G., Somers, G., van Obberghen, E. (1974)
Glucose metabolism and insulin release: The role of glyceraldehyde.
Diabetologia 10, 379

Malaisse, W.J., Herchuelz, A., Devis, G., Somers, G., Boschero, C., Hutton, J.C., Kawazu, S., Sener, A. (1978a)
Regulation of calcium fluxes and their regulatory roles in pancreatic islets.
In: Calcium transport and cell function, Vol 307
The New York Academy of Sciences pp 562-582

Malaisse, W.J., Hutton, J.C., Kawazu, S., Herchuelz, A., Valverde, I., Sener A., (1979)
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXXV. The links between metabolic and cationic events.
Diabetologia 16, 331-341

Malaisse, W.J., Hutton, J.C., Kawazu, S., Sener, A. (1978a)
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Metabolic effects of menadione in isolated islets.
Eur. J. Biochem. 87, 121-130

Malaisse, W.J., Lea, M.A., Malaisse-Lagae, F. (1968)
The effect of mannoheptulose on the phosphorylation of glucose and the secretion of insulin by islets of Langerhans.
Metabolism 17, 126-132

Matschinsky, F.M., Ellerman, J.E. (1973)
Dissociation of the insulin releasing and the metabolic functions of hexoses in islets of Langerhans.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 50, 193-199

Meissner, H.P. (1976)
Electrical characteristics of the beta-cells in pancreatic islets.
J. Physiol. Paris 72, 757-767

Meissner, H.P., Henquin, J.C., Preissler, M. (1978)
Potassium dependence of the membrane potential of pancreatic B-cells.
FEBS Letters 94, 87-89

Meissner, H.P., Preissler, M. (1979)
Glucose-induced changes of the membrane potential of pancreatic B-cells: Their significance for the regulation of insulin release.
In: Treatment of early diabetes, ed. by R.A. Camerini-Davalos, B. Hanover.
Plenum Press, New York pp 97-107

Meissner, H.P., Schmelz, H. (1974)
Membrane potential of beta-cells in pancreatic islets.
Pflügers Archiv 351, 195-206

Niklas, H. (1978)
Dissertation, Tübingen

Okamoto, H. (1981)
Regulation of proinsulin synthesis in pancreatic islets and a new aspect to insulin-dependent diabetes.
Mol. et Cell. Biochem. 37, 43-61

Pace, C.S., Ellerman, E., Hover, B.A., Stillings, S.N., Matschinsky, F.M. (1975)
Multiple metabolic functions of glucose in rat pancreatic islets.
Diabetes 24, 476-488

Pace, C.S., Matschinsky, F.M., Lacy, P.E., Conant, S. (1977)
Electrophysiological evidence for the autoregulation of ß-cell secretion by insulin.
Biochim. Biophys. Acta 497, 408-414

Panten, U., Christians, J., von Kriegelstein, E., Poser, W., Hasselblatt, A. (1973)
Effects of carbohydrates upon fluorescence of reduced pyridine nucleotides from perifused isolated pancreatic islets.
Diabetologia 9, 477-482

Petersen, O.H. (1976)
Electrophysiology of mammalian gland cells.
Physiol. Rev. 56, 535-577

Pitkin, R.M., Reynolds, W.A. (1970)
Diabetogenic effects of streptozotocin in rhesus monkeys.
Diabetes 19, 85-90

Rakieten, N., Rakieten, M.L., Nadkarni, M.V. (1963)
Studies on the diabetogenic action of streptozotocin.
Cancer Chemother. Rep. 29, 91

Rappaport, A.M., Ohira, S., Coddling, J.A., Empey, G., Kalnins, A., Lin, B.J., Haist, R.E. (1972)
Effects on insulin output and on pancreatic blood flow of exogenous insulin infusion into an in situ isolated portion of the pancreas.
Endocrinology 91, 168-176

Rerup, C., Tarding, F. (1969)
Streptozotocin and alloxan diabetes in mice.
Europ. J. Pharmacol. 7, 89-96

Rink, H. (1974)
Thiol compounds in radiation biology.
In: Glutathione. Proc. of the 16th conference of the german society of biological chemistry. eds. L. Flohe, R.C. Benöhr, H. Siess, H.D. Waller, A. Wendel.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York pp 206-216

Ritter, D.A. (1973)
The role of the pyridine nucleotides in the diabetogenicity of streptozotocin.
Diss. abstracts internat. B 34, 2826

Robbins, M.J., Sharp, R.A., Slonim, A.E., Burr, I.R. (1980)
Protection against streptozotocin-induced diabetes by superoxide dismutase.
Diabetologia 18, 55-58

Robinson, R.A., Stokes, R.H. (1969)
Electrolyte solutions.
Butterworth, London

Schein, P.S., Cooney, D.A., McMenamin, M.G., Anderson, T. (1973)
Streptozotocin diabetes - further studies on the mechanism of depression of nicotinamide adenine dinucleotide concentrations in mouse pancreatic islets and liver.
Biochem. Pharmacol. 22, 2625-2631

Schein, P.S., Loftus, S. (1968)
Streptozotocin: Depression of mouse liver pyridine nucleotides.
Cancer Res. 28, 1501-1506

Sehlin, J. (1978)
Chloride ions in ß-cell stimulus-secretion coupling.
Diabetologia 15, 269

Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1974)
Transport of rubidium and sodium in pancreatic islets.
J. Physiol. London 242, 505-515

Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1975)
Glucose-induced decrease in Rb permeability in pancreatic ß-cells.
Nature 253, 635-636

Sener, A., Hutton, J.C., Kawazu, S., Boschero, A.C., Somers, G., Devis, G., Herchuelz, A., Malaisse, W.J. (1978)
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Metabolic and functional effects of NH_4 in rat islets.
J. Clin. Invest. 62, 868-878

Slonim, A.E., Sharp, R., Rogers, M., Felts, P., Burr, I.R. (1977)
Vitamin E protection against streptozotocin induced diabetes.
Diabetes 26, Suppl. 1, 417

Sodoyez, J.C., Sodoyez-Goffaux, F., Foa, P.P (1969)
Pathogenesis of hypoglycemia in hamsters with a transplantable islet-cell tumor.
J. Lab. Clin. Med. 73, 432-438

Soeldner, J.S., Slone, D. (1965)
Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using the double antibody technique.
Diabetes 14, 771-779

Strölin, W., Ammon, H.P.T. (1983)
Unterschiedliche Wirkung von reduziertem Glutathion (GSH) auf die 45-Calciumaufnahme in Pankreasinseln erwachsener und fötaler Ratten.
Akt. Endokrinologie und Stoffwechsel 4, Abstract

Umbreit, W.W., Burris, R.H., Stauffer, J.P. (1972)
Manometric and biochemical techniques.
5th edition, Burgess Publ. Co., Minneapolis, USA, p 146

Verspohl, E.J., Ammon, H.P.T. (1980)
Evidence for presence of insulin receptors in rat islets of Langerhans.
J. Clin. Invest. 65, 1230-1237

Verspohl, E.J., Händel, M., Ammon, H.P.T. (1979)
Pentose phosphate shunt activity of rat pancreatic islets: Its dependence on glucose concentration.
Endocrinology 105, 1269-1274

Verspohl, E.J., Händel, M., Hagenloh, I., Ammon, H.P.T. (1982)
In vitro effect of exogenous insulin on insulin secretion. Studies with glucose, leucine, arginine, aminophylline and tolbutamide.
Acta. diabet. Lat. 19, 303-317

Verspohl, E.J., Schenzle, D., Ammon, H.P.T. (1982a)
Properties of the insulin receptor of rat pancreatic islet.
Biochim. Biophys. Acta 716, 258-265

Wagle, S.R. (1965)
Studies on biosynthesis and catabolism of insulin.
Biochim. Biophys. Acta 107, 524-525

Wahl, M. (1983)
Dissertation, Tübingen

Wilander, E., Boquist, L. (1972)
Streptozotocin-diabetes in the chinese hamster. Blood glucose and structural changes during the first 24 h.
Hormone and Metabolic Research 4, 426-433

Wilander, E., Gunnarsson, R. (1975)
Diabetogenic effects of N-nitrosomethylurea in the chinese hamster.
Acta path. microbiol. scand. Sect. A 83, 206-212

Yamamoto, H., Okamoto, H. (1980)
Protection by picolinamide, a novel inhibitor of poly(ADP-ribose)synthetase, against both streptozotocin-induced depression of proinsulin biosynthesis and reduction of NAD-content in pancreatic islets.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 95, 474-481

Zawalich, W.S., Pagliari, A.S., Matschinsky, F.M. (1977)
Effects of iodoacetate, mannoheptulose and 3-O-methylglucose on the secretory function and metabolism of isolated pancreatic islets.
Endocrinology 100, 1276-1283

Zehran, K. (1980)
Competition between potassium and rubidium ions for penetration of the midgut of Hyalophora cecropia larvae.
J. Exp. Biol. 86, 341-344

L E B E N S L A U F

Am 9. November 1956 wurde ich, Michael Mark, als Sohn des Regierungslandwirtschaftsdirektors Ägidius Mark und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Leuser in Horb a.N. geboren.

Von April 1963 bis Dezember 1966 besuchte ich die Grundschule in Stuttgart-Fasanenhof und wechselte anschließend an das Wilhelmsgymnasium Stuttgart-Degerloch über, wo ich im Mai 1975 die Reifeprüfung ablegte.

Von Juli 1975 bis September 1976 leistete ich meinen Wehrdienst ab.

Im Oktober 1976 nahm ich an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen das Studium der Pharmazie auf und legte dort im September 1978 den ersten Teil, im März 1980 den zweiten Teil der Pharmazeutischen Prüfung ab.

Vom 1. April 1980 bis zum 31. März 1981 war ich als Pharmaziepraktikant in der Hof-Apotheke, Stuttgart tätig und bestand im April 1981 den dritten Teil der Pharmazeutischen Prüfung.

Die Approbation als Apotheker wurde mir am 4. Mai 1981 erteilt.

Im Mai 1981 begann ich an der Universität Tübingen bei Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon mit der vorliegenden Dissertation, die ich im Mai 1983 abschloß.

Während dieser Zeit war ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen angestellt.

Am 11. September 1982 heiratete ich Frau Sabina Mark, geb. Grauer aus Stuttgart.

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon waren die Herren Professoren

H. Auterhoff, K.-A. Kovar, J. Schultz (Pharmazeutische Chemie); E. Graf, H. Hamacher (Pharmazeutische Technologie); E. Reinhard (Pharmazeutische Biologie); E. Lindner, E. Bayer (Chemie); K. Botzenhart (Medizinische Mikrobiologie); H. Seiler (Physik); M. Siess (Pharmakologie)